

Aus dem Institut für Allgemeine und Spezielle Pathologie
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg (Saar)
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Rainer M. Bohle

Zytospin- und Histogelanalysen zur präzisen Lungenkrebsdiagnostik

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes
2023

vorgelegt von: Melanie Dölker
geboren am: 20.09.1994 in 72461 Albstadt

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung/Abstract.....	1
1.1	Zielsetzung.....	1
1.2	Material und Methodik.....	1
1.3	Ergebnisse.....	1
1.4	Schlussfolgerung.....	2
1.5	Purpose.....	3
1.6	Material and methods.....	3
1.7	Results.....	3
1.8	Conclusion.....	4
2	Einleitung.....	5
2.1	Kompodium.....	5
2.2	Lungenkarzinome.....	6
2.3	Diagnostik.....	9
3	Fragestellung und Zielsetzung.....	14
4	Material und Methodik.....	15
4.1	Material.....	15
4.2	Methodik.....	20
5	Ergebnisse.....	34
5.1	Klinisch-histopathologische Parameter des Kollektivs.....	34
5.2	Auswertung zu den einzelnen Tumorsubtypen bei der Histologie und der zytologischen Überstandsdiagnostik.....	38
5.3	Fallbeispiele.....	55
5.4	Korrelation der Überstandsdiagnostik mit der Histologie.....	63
5.5	Auswertung eventueller Einflussfaktoren.....	64
5.6	Auswertung der auffälligen Überstandszytologie.....	72
5.7	Vergleich Histogelblock-Paraffinblock am Beispiel von BRAS.....	74

6	Diskussion	78
6.1	Patientenkollektiv	78
6.2	Methodenvergleich	79
6.3	Klinische und morphologische Standardparameter	82
6.4	Einflussfaktoren auf die Überstandszytologie	84
6.5	Vergleich Überstandsdiagnostik mit Histologie	86
6.6	Vor- und Nachteile der Überstandszytologie	90
6.7	Biasbetrachtung	93
6.8	Fazit	94
7	Literaturverzeichnis	95
8	Abbildungsverzeichnis	99
9	Tabellenverzeichnis	101
10	Publikationen	102
11	Dank	103
12	Anhang	104
12.1	Immunhistochemische Typisierung von CK positiven, morphologisch nicht unterscheidbaren NSCLC	104
12.2	Verteilung der Tumorsubtypen auf die Lungenlokalisationen	105
12.3	Lebenslauf	109

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
abs.	absolut
AC	Adenokarzinom
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BRAS	Bronchialaspirat
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD (+Zahl)	cluster of differentiation – Unterscheidungsgruppe
CEA	carcinoembryonic antigen – carcinoembryonales Antigen
CK (+Zahl)	Zytokeratin
CT	Computertomographie
EBUS	endobronchialer Ultraschall
EBUS-GS	endobronchial ultrasound with a guide sheath – endobronchialer Ultraschall mit Führungskatheter
EGFR	epidermal growth factor receptor - Rezeptorproteinkinase
et al.	et alii/aliae/alia – und andere/r
evtl.	eventuell
h	hour - Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
Immunf.	Immunfärbung
inkl.	inklusive
IMBEI	Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik
KRAS	Kirsten-rat-sarcoma-viral-oncogene – monomeres G-Protein
LCA	leukocyte common antigen – gemeinsames Leukozytenantigen
min	minute – Minute
MTA	medizintechnische Angestellte
n	Anzahl
NGS	next-generation-sequencing – Sequenzierung der nächsten Generation
NPW	negativer prädiktiver Wert
NSCLC	non-small cell lung cancer – nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom

NSCLC-NOS	non-small cell lung cancer - not otherwise specified – nicht kleinzelliges Bronchialkarzinom nicht weiter spezifizierbar
PE	Probenentnahme
PEC	Plattenepithelkarzinom
PET-CT	Positronen-Emissions-Tomographie kombiniert mit Computertomographie
PPW	positiver prädiktiver Wert
p-Wert	Signifikanzwert, Überschreitungswahrscheinlichkeit
Rpm	rounds per minute – Umdrehungen pro Minute
RB	rechter Bronchus
rel.	relativ
s	second - Sekunde
SCLC	small cell lung cancer – kleinzelliges Bronchialkarzinom
TBB	transbronchiale Biopsie
TBNA	transbronchiale Nadelaspiration
TTF-1	thyroid transcription factor 1 – thyroider Transkriptionsfaktor 1
Überstandszyt.	Überstandszytologie
UKS	Universitätsklinikum des Saarlandes
v. a.	vor allem
WHO	world health organisation – Weltgesundheitsorganisation
z. B.	zum Beispiel
zyt.	zytologisch

1 Zusammenfassung/Abstract

1.1 Zielsetzung

Maligne Lungentumore gehören zu den häufigsten tumorbedingten Todesursachen, weshalb eine adäquate und schnelle Diagnostik sehr wichtig ist. Goldstandard in der histopathologischen Diagnostik ist die histologische Aufarbeitung einer Biopsie. Durch weitere zytologische Methoden wie bronchoalveoläre Lavage und Bronchialaspirat wird die Histologie standardmäßig ergänzt.

Eine neue, zusätzliche Diagnosemöglichkeit bietet die Überstandszytologie. Ziel dieser Arbeit ist festzustellen, wie geeignet die Überstandszytologie zur Diagnose maligner Lungentumore im Vergleich zur Histologie ist und durch welche Einflussfaktoren sie eventuell günstig oder ungünstig beeinflusst werden kann.

1.2 Material und Methodik

Das zugrundeliegende Kollektiv besteht aus $n=564$ Biopsaten und ihren Überständen mit Verdacht auf einen malignen Lungentumor. Die entsprechenden Befunde wurden retrospektiv betrachtet, aufgearbeitet und durch weitere benötigte Informationen, wie zum Beispiel weitere Befunde des Patienten, aus anderen Instituten ergänzt.

Zur genaueren Differenzierung in die zwei Aufarbeitungsmethoden des Überstandes, das Zytospinpräparat und der zytologische Histogelblock, wurden $n=172$ Fälle nachmikroskopiert und die Befunde in Einzelbefunde der jeweiligen Methode aufgetrennt.

Die statistische Analyse erfolgte mit dem Chiquadrat-Test, dem exakten Test nach Fisher und dem Test für verbundene Stichproben nach McNemar.

1.3 Ergebnisse

Durch Überstandszytologie, Histologie und entsprechende immunhistochemische Färbungen konnten von dem Gesamtkollektiv von $n=564$ Fällen in $n=430$ Fällen ein maligner Tumor oder ein Carcinoma in situ festgestellt werden. Die Überstandszytologie zeigte dabei in $n=98$ (17,4%) Fällen ein positives Ergebnis, während die Histologie in $n=416$ (73,8%) Fällen in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung ein positives Ergebnis zeigte. Durch immunhistochemische Färbungen konnten weitere verdächtige oder zweifelhafte Fälle später bestätigt werden. So konnte mit einem Signifikanzwert von $p<0,001$ festgestellt werden, dass ein signifikanter Unterschied in den beiden Methoden besteht.

In n=396 zeigte die Überstandszytologie einen „zweifelhaften“ oder „verdächtigen“ Befund. Dieser konnte zu einem großen Teil (n=260) durch die Histologie oder immunhistochemische Färbungen belegt werden. Durch weitere Einsendungen desselben Patienten konnten in n=48 Fällen in der gleichen Lokalisation ein maligner Tumor festgestellt und der auffällige Befund somit bestätigt werden. Auch hier besteht ein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit in welcher der Überstandsbefund „zweifelhaft“ oder „verdächtig“ bestätigt oder widerlegt werden konnte.

Betrachtet man eventuelle Einflussfaktoren, lässt sich mit Signifikanzwerten von $p > 0,05$ feststellen, dass weder die Lokalisation der Biopsieentnahme, das Grading des malignen Tumors noch der Tumorsubtyp einen Einfluss auf die Wertigkeit der Methode der Überstandszytologie hat.

In n=172 Fällen wurde der Überstandsbefund in je einen Befund für das Zytospinpräparat und den zytologische Histogelblock aufgetrennt. Mit einem Signifikanzwert von $p < 0,001$ zeigte sich ein Unterschied in den Ergebnissen der beiden Aufarbeitungsmethoden. So zeigten die Präparate aus dem zytologischen Histogelblock häufiger positive Ergebnisse als die Zytospinpräparate.

1.4 Schlussfolgerung

Die histologische Aufarbeitung der Biopsien sollte weiterhin der Goldstandard in der Diagnostik maligner Lungentumore bleiben. Die Aufarbeitung der entsprechenden Überstandsflüssigkeiten der Biopsien bietet jedoch eine wichtige Möglichkeit, weiteres Tumorzellmaterial zu sichern. Weiterhin kann die Befundung dieses Materials die an der Histologie gestellte Krebsdiagnose bestätigen, in seltenen Fällen (bei denen in dieser Arbeit untersuchten Fällen n=1) kann eine Krebsdiagnose auch alleinig an der Überstandszytologie mithilfe von immunchemischen Färbungen gestellt werden.

Des Weiteren bietet die Aufarbeitung der Überstandszytologie zu Histogelblöcken wertvolle Möglichkeiten zur Asservierung und weiterführenden Diagnostik von Tumorzellmaterial. Bei der retrospektiven Aufarbeitung der Befunde im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit wurden im Vergleich zur Methode des Zytospinpräparates (n=20 positive Befunde von 172) signifikant mehr positive Befunde mithilfe der Methode der Histogelblockaufarbeitung festgestellt (n=43 positive Befunde von 172).

Somit sollte abschließend neben der Aufarbeitung der Biopsien für die Histologie zur Optimierung der Befunderstellung sowie insbesondere zur Gewinnung und Asservierung von weiterem Tumorzellmaterial die entsprechende Fixierungsflüssigkeit in Form von Histogelblöcken aufgearbeitet werden.

1.5 Purpose

Lung cancer is one of the most frequent causes of cancer-related deaths. Due to this, a fast and appropriate diagnosis is crucial. So far, the gold standard for diagnosis is histologic assessment of a biopsy. Further cytological methods such as bronchoalveolar lavage and endotracheal aspiration were added to the main standard in recent years.

A new, additional method of diagnosis is supernatant cytology. The purpose of this paper is to investigate the effectiveness of supernatant cytology in the diagnosis of lung cancer compared to a histologic assessment of the biopsy. Additionally, possible positive and negative aspects of supernatant cytology are identified.

1.6 Material and methods

The research is based on a collective of $n=564$ biopsies and the corresponding supernatants from cases suspicious for a malignant lung tumor. The findings were treated retrospectively and supplemented with additional information, such as further clinical reports of the patients. For a better distinction between the two cytological methods, cytospin and cell block, $n=172$ specimens were re-microscoped and the findings divided into the respective methods. The statistical analysis is based on the Chi-square test, Fisher's exact test and McNemar's test.

1.7 Results

By supernatant cytology and histology, a lung tumor or carcinoma in situ could be detected in $n=430$ cases out of the total collective of $n=564$ cases. In $n=98$ (17.4%) supernatant cytology showed a positive result, while histology (hematoxylin-eosin staining) showed a positive result in $n=416$ (73.8%) cases. Analysis showed a significant difference between the two methods ($p<0.001$).

In $n=396$, the supernatant cytology showed a "doubtful" or "suspicious" finding. This could be supported to a large extent ($n=260$) by histology or immunohistochemical staining. By further submissions from the same patients, a lung tumor could be detected in $n=48$ cases in the same location and the conspicuous findings could thus be confirmed. Here, too, the difference between the two methods achieved statistical significance.

Looking at possible influencing factors, it can be determined with a statistical significance of $p>0.05$ that neither the location of the biopsy, the grading of the lung tumor or the tumor subtype has an influence on the value of the method of supernatant cytology. In $n=172$ cases, the supernatant finding was separated into one result each for the cytospin specimen and the cell block. With a statistical significance of $p<0.001$, there was a difference in the results of the two

reprocessing methods. For example, the preparations from the cell block showed more positive results than the cytopsin specimen.

1.8 Conclusion

The histologic assessment reprocessing of biopsies should continue to be the gold standard in the diagnosis of lung tumors.

However, the processing of the corresponding supernatant fluids of the biopsies offers an important opportunity to secure further tumor cell material. Furthermore, the diagnosis of this material can confirm the cancer diagnosis made at histology, in rare cases (in this work $n = 1$ case) a cancer diagnosis can also be made only on the supernatant cytology using immunochemical staining. Furthermore, the processing of supernatant cytology to cell blocks offers valuable possibilities for the preservation and further diagnosis of tumor cell material. In the retrospective processing of the findings in the context of this scientific work, significantly more positive findings were found using the method of cell block processing ($n=43$ positive findings out of 172) compared to the method of cytopsin preparation ($n=20$ positive findings out of 172). Thus, in addition to the processing of the biopsies for histology to optimize the diagnosis and, in particular, to obtain and preserve further tumor cell material, the corresponding fixation fluid in form of cell blocks should be processed.

2 Einleitung

2.1 Kompendium

Weltweit sterben 1,2 Millionen Menschen pro Jahr an malignen Lungentumoren. Sie sind somit die häufigste Ursache eines tumorbedingten Todes [9]. So haben maligne Lungentumore mit ca. 2 Millionen einen Anteil von 11,6% an allen Tumorneuerkrankungen [12].

In Deutschland bilden maligne Lungentumore einen großen Anteil der Krebserkrankungen, die absolute Zahl der Neuerkrankungen bei malignen Lungentumoren lag im Jahr 2013 für Frauen bei 18 810 und für Männer bei 34 500. Neben der Inzidenz ist auch die Mortalität im Industrieland Deutschland bezogen auf maligne Lungentumore nach wie vor sehr hoch: im Jahr 2013 lag die Mortalität von Frauen bei 15 140 und bei Männern bei 29 708 Patienten [41]. Die Ursache dafür ist, dass Lungenkarzinome kaum spezifische Frühsymptome verursachen und deshalb oft erst in fortgeschrittenen Tumorstadien entdeckt werden [2].

Den größten Anteil der malignen Lungentumore stellen die Lungenkarzinome (v. a. Adenokarzinome, Plattenepithelkarzinome, kleinzellige Karzinome) dar [6].

Um die Krebserkrankung dennoch möglichst früh zu erkennen, ist eine adäquate Diagnostik unabdingbar. Einen hohen Stellenwert in der morphologischen Lungenkarzinomdiagnostik nimmt dabei die Durchführung einer Bronchoskopie mit Gewebeentnahme ein [46].

Um die Diagnose eines Lungenkarzinoms zu stellen, wird das gewonnene Material in der Pathologie analysiert und aufgearbeitet, um dadurch ein histopathologisches Präparat zu erhalten. Dabei ist die histologische Klassifizierung ein wesentliches Ziel [6].

Als Ergänzung zu Biopsien werden oft in den gleichen Untersuchungssitzungen auch zytologische Proben, insbesondere in Form von Bronchialaspiraten (BRAS) oder bronchoalveolären Lavagen (BAL), gewonnen. Ergänzend kann eine zytologische Analyse der abgeschilferten Zellen und Zellgruppen des Biopsats durchgeführt werden, die sogenannte „Überstandszytologie“ (Überstandszyt.). Dabei wird untersucht, ob vom Biopsat evtl. Tumorzellen in der Fixationslösung nachweisbar sind und so eine ergänzende zytologische Tumordiagnose möglich ist. Die zytologischen Methoden zeigen bisher sowohl in der Tumordiagnostik [15], als auch bei infektiösen Krankheiten wie Soor und Giardiasis des Gastrointestinaltraktes gute Erfolge und nehmen eine immer größere Rolle in der Diagnostik ein [15,35,45].

Mit der vorliegenden Arbeit soll die diagnostische Wertigkeit von Überstandszytologien im Vergleich zur Histologie bei Lungenkarzinomen analysiert werden. Des Weiteren wird anhand bewährter Diagnostik mit BRAS-Präparaten geprüft, ob eine Aufarbeitung zu Paraffinblöcken oder eine spezielle Einbetttechnik des zytologischen Zellmaterials bessere Diagnosemöglichkeiten bietet.

2.2 Lungenkarzinome

2.2.1 Einteilung

Lungenkarzinome werden derzeit nach dem Werk der WHO - Thoracic Tumour: WHO Classification of Tumours nach histopathologischen Kriterien eingeteilt [29].

Haupttrisikofaktor für die Entstehung der meisten Lungenkarzinome ist der Tabakkonsum [29].

2.2.2 Adenokarzinome

Adenokarzinome bilden mit einem Anteil von ca. 40% die größte Gruppe der malignen Lungentumore [47]. Adenokarzinome werden auch vermehrt, nämlich in ca. 30% der Fälle, bei Nichtrauchern festgestellt [27].

Der häufigste Wachstumsort der Adenokarzinome ist in der Lungenperipherie, da sich vor allem in den Alveolen und Bronchiolen das drüsige Ursprungsgewebe findet [23,29]. Die Tumordoppelungszeit liegt bei ca. 180 Tagen [23].

Makroskopisch zeigen die Adenokarzinome eine grau-weißliche Schnittfläche. Zentral in den Knoten können sie fibrosiert sein und Mischstaubeinlagerungen aufweisen [29].

Mikroskopisch lassen sich im histologischen Präparat je nach Anordnung der Tumorzellen unterschiedliche Wachstumsmuster erkennen: azinär, papillär, solide, kribriform, lepidisch und/oder mikropapillär. Nach dem ermittelten Wachstumsmuster erfolgt die Einteilung in verschiedene Differenzierungsgrade, das sogenannte Grading [29].

Meist zeigen Adenokarzinome verschiedene Wachstumsentitäten, weshalb ein prädominanter Wachstumstyp und weitere vorhandene Wachstumsmuster im Befund angegeben werden [29]. Eine Einteilung in die Subtypen kann in zytologischen Proben schwierig sein, sodass Zytoplasma- und Kernkriterien (und/oder Spezialfärbungen für Muzin) für die Einteilung herangezogen werden müssen [6].

Die Nuklei der Zellen liegen für gewöhnlich im äußeren Bereich des Zytoplasmas der Zellen und enthalten vesikuläres Chromatin und auffällige Nukleoli. Im Cytoplasma lassen sich feine, granulierte Vakuolen und in einigen Fällen auch Muzin erkennen [14,29].

2.2.3 Plattenepithelkarzinome

Plattenepithelkarzinom bilden mit einem Anteil von ca. 30% die zweitgrößte Gruppe der Lungenkarzinome [47]. Noch viel stärker als bei Adenokarzinomen ist das Auftreten von Plattenepithelkarzinomen im Zusammenhang mit Tabakrauchen assoziiert. In über 90% der Plattenepithelkarzinome lässt sich ein solche Zusammenhang eruieren [27].

Weitere Risikofaktoren für das Auftreten von Plattenepithelkarzinomen ist die Exposition gegenüber Schwermetallen sowie radon- und arsenhaltigen Substanzen [29].

Man unterteilt die Plattenepithelkarzinome in verhornende, nicht verhornende und basaloide Plattenepithelkarzinome [29]. Basaloide Plattenepithelkarzinome sind im Vergleich zu den anderen beiden Subgruppen selten und werden deshalb im Weiteren nicht ausgeführt.

Plattenepithelkarzinome haben ihren Wachstumsursprung eher zentral in einem Haupt- oder Lappenbronchus und zeigen eine Tumorverdopplungszeit von ca. 300 Tagen [23].

An den Schnittflächen zeigen sich die Plattenepithelkarzinome mit gräulich-weißer Färbung und weicher, bröcklicher Konsistenz, welche oft durch zentrale Nekrosen bedingt ist. Durch die Nekrosen können sich auch kavitätäre Defekte im Tumorzentrum bilden [29]. Sie können auch ein exophytisches, polypoides Wachstum in das Bronchuslumen aufweisen, was zu dessen Verlegung führen kann [29].

Histologisch ist der verhornende Typ gekennzeichnet durch sogenannte Hornperlen und/oder vermehrte Interzellulärbrücken. Durch den Grad der Verhornung lässt sich unter anderem auch eine Aussage über die Differenzierung des Karzinoms machen. So weisen besser differenzierte Plattenepithelkarzinome häufiger Verhornungstendenzen auf als schlechter differenzierte [19].

Zytologisch zeigen sich bei gut differenzierten Plattenepithelkarzinomen häufig spindelförmige Zellen, deren Nuklei eine dunkle, undurchsichtige Färbung ohne auffällige Nukleoli aufweisen. Es können auch keratinisierte Zellen erkennbar sein. Nicht verhornende, schlecht differenzierte Plattenepithelkarzinome sind häufig schwer von Adenokarzinomen zu unterscheiden, da sich das Zellbild ähnelt. Hier wird eine Unterscheidung anhand der Charakteristika der Nuklei und des Chromatins versucht. Die Nuklei der Plattenepithelkarzinome können Chromatin und auffällige Nukleoli enthalten. Um eine genaue Differenzierung zwischen einem schlecht differenzierten, nicht verhornenden Plattenepithelkarzinom und einem Adenokarzinom zu erreichen, sind oft immunhistochemische Untersuchung notwendig [14,29].

2.2.4 Kleinzellige Karzinome

Die kleinzelligen Bronchialkarzinome bilden eine eigene Gruppe, die SCLC (small cell lung cancer) und machen einen Anteil von ca. 15% aller Lungenkarzinome aus [4].

Das kleinzellige Karzinom ist per definitionem ein niedrig differenzierter, sogenannter „high-grade“-Tumor [7,23,29], weshalb dieser Tumorsubtyp hinsichtlich des Differenzierungsgrades in dieser Arbeit dem Grading „G4“ zugeordnet wird. SCLC zeigen in einem Großteil der Fälle eine Ausprägung von neuroendokrinen Markern, da sie von multipotenten Vorläuferzellen abstammen und so zur neuroendokrinen Sekretion von Stoffen fähig sind [29].

Die SCLC wachsen mehrheitlich zentral in den großen Luftwegen, vorzugsweise perihilär, mit nachfolgender Obstruktion der anhängenden Lumina. Sie breiten sich vor allem radiär subepithelial aus und infiltrieren rasch die umliegenden Lymphknoten [29]. Mit einer Tumorverdopplungszeit von nur 10-15 Tagen wächst das kleinzellige Karzinom erheblich schneller als die NSCLC [23]. Auch zeigen SCLC bei Diagnosestellung häufiger Symptome, die auf Fernmetastasen hinweisen als bei NSCLC [29].

Makroskopisch imponiert das kleinzellige Karzinom als eine große perihiläre Gewebsmasse, die nach einiger Zeit zur peribronchialen Obstruktion führt. Bedingt durch das schnelle Wachstum zeigen sich häufig nekrotische Tumoranteile [29].

In der Histologie sind eng beieinanderliegende, kleine, zytoplasmaarme Zellen mit verschwommenen Zellgrenzen auszumachen. Dabei ist die Kern-Plasma-Relation deutlich in Richtung Nukleus verschoben. Die Nuklei sind spindelförmig, oval oder rund und mit feingranuliertem Chromatin gefüllt. In ihnen sind keine oder sehr unauffällige Nukleoli zu sehen. Ein weiteres Zeichen für ein kleinzelliges Karzinom ist das „nuclear moulding“, eine Verformung der Nuklei durch benachbarte Nuklei [29].

In der zytologischen Unterscheidung zu NSCLC macht man sich die häufig vorliegende rosettenförmige Anordnung der Zellen zu Nutze. In direkter Nachbarschaft zu den Tumorzellen sind manchmal auch dunkle apoptotische Zellen und nekrotisches Material erkennbar [14,29].

2.3 Diagnostik

Um eine adäquate Tumordiagnostik der oben dargestellten Lungentumoren zu erreichen, werden verschiedene Methoden der Probengewinnung und -aufarbeitung verwendet. Für den Patienten ist dabei ein möglichst schonendes Vorgehen wichtig, während für eine gute Diagnostik eine möglichst gute Probenqualität benötigt wird. Um diese Punkte für beide Seiten zu optimieren, wird versucht, das gewonnene Probenmaterial möglichst wenig invasiv und patientenschonend zu gewinnen und vollständig zu verarbeiten. Durch Aufarbeitung aller Probenbestandteile ermöglicht dies eine Asservierung eines Probenteils für weiterführende histopathologische und molekularbiologische Untersuchungen ohne weitere Patientenbelastung.

2.3.1 Klinische Probengewinnung für die histo- und zytopathologische Auswertung

2.3.1.1 Bronchoskopie

Die Bronchoskopie ist das wichtigste minimalinvasive Verfahren zur Gewebebegewinnung in der pulmonalen Tumordiagnostik [32]. Durch eine adäquate Bronchoskopie ist es möglich mehrere verschiedene Proben für die weitere Untersuchung zu gewinnen. So werden meist zuerst je eine Probe für BRAS und BAL asserviert. Anschließend wird eine histologische Probengewinnung angestrebt. Aus dieser kann wiederum in der weiteren Aufarbeitung der Überstand gewonnen und getrennt aufgearbeitet werden.

Durch eine gute Bronchoskopie ist es so in der histologischen Probe möglich mit einer Sensitivität von 88% zentrale Pathologien und je nach Biopsiemethode und Tumorzellmenge mit einer Sensitivität von 36-88% periphere Pathologien zu erkennen [1,22].

Weitere Informationen zur Bronchoskopie werden in Punkt 4.2.1 aufgeführt.

2.3.1.2 Invasive Verfahren

Kann bei einem Patienten durch die oben genannten Proben keine dem klinischen Bild entsprechende Diagnose gestellt werden, werden invasivere Maßnahmen benötigt. Hier können in der Folge eine perkutane Feinnadelpunktion unter CT- oder Röntgenkontrolle oder chirurgische Maßnahmen, wie Thorakotomie oder Primäroperation, nötig werden [46]. Diese Methoden bergen allerdings höhere Risiken wie größere Blutungs- und Infektionsgefahr, Schmerzen, Schwellungen und Wundheilungsstörungen. In manchen Fällen können die Tumorzellen durch den Untersuchungskanal verschleppt werden und so eine Tumorausbreitung begünstigen.

Um diese Risiken nach Möglichkeit zu vermeiden ist es wichtig, die bronchoskopisch gewonnenen Proben möglichst gut zu nutzen, um eine bestmögliche Diagnose ohne invasive Maßnahmen zu gewährleisten.

2.3.2 Histo- und zytopathologische Diagnostik

Für die Diagnostik bei Lungenkarzinomen werden standardmäßig zytologische Proben wie BRAS und/oder Bürstenabstriche entnommen. Auch die Überstandszytologie ist in der zytologischen Diagnostik von Lungenkarzinomen schon seit einiger Zeit etabliert. Durch erfahrene Befunder kann auch an einem zytologischen Präparat direkt eine Tumordiagnose gestellt werden [6].

Die Problematik ist allerdings, dass diese Methoden oft in einer Diagnosesitzung entnommen werden, aber bisher häufig getrennt untersucht und befundet werden. Sehr wichtig ist jedoch die gemeinsame Beurteilung in Zusammenschau aller entnommener Proben. So können laut W. Böcker et al. und L. Bubendorf über 80% klinischer Verdachtsdiagnosen auf einen malignen Lungentumor in der Zusammenschau von zytologischen und histologischen Proben diagnostiziert werden [6,14].

Am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes (UKS) werden deshalb seit 2007 zusätzlich zu den histopathologischen Präparaten zytopathologische Untersuchungen durchgeführt und in die Kategorien negativ, zweifelhaft, verdächtig und positiv eingeteilt. Um kein Probenmaterial zu verschwenden und die Diagnostik weiter zu verbessern, werden aus den abzentrifugierten Flüssigkeiten des Überstands sowie aus dem BRAS-Material standardmäßig zytologische Histogelblöcke angefertigt. Diese dienen zu weiterführenden molekulargenetischen und immunhistochemischen Untersuchungen. Alle gewonnenen Präparate werden dabei von einem Arzt befundet, um in der Zusammenschau aller Befunde eine entsprechende Diagnose zu stellen.

2.3.2.1 Überstandszytologie

Bei der Methode der Überstandszytologie werden die Fixationslösungen der histologischen Gewebestücke abzentrifugiert und ebenfalls verwendet. Diese werden in zwei verschiedenen Verfahren, nämlich als Zytospinpräparat und als zytologischer Histogelblock, aufgearbeitet.

Der zytologische Histogelblock erlaubt die Asservierung der Proben für weitergehende Untersuchungen.

Dabei können in den zytologischen Präparaten anhand der Zell- und Kernmorphologie (z. B. Kern-Plasma-Verhältnis, Anisozytose) und der Mitoserate Aussagen über die Dignität der Zellen getroffen werden [46].

2.3.2.2 Immunchemische Färbungen

Die entnommenen Proben werden aufgearbeitet und zunächst in einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) betrachtet. Lässt sich hierbei anhand der Wachstumsmuster oder der Morphologie keine genaue Tumordiagnose stellen, werden Immunfärbungen (Immunf.) zur weiteren Differenzierung angewandt.

Durch die verschiedene Anfärbbarkeit der charakteristischen Strukturen der einzelnen Tumorsubtypen mit den unterschiedlichen Antikörpern der Immunfärbungen ergibt sich für viele Tumorarten ein spezifisches Bild.

Sowohl bei den histologischen Präparaten als auch bei zytologischen Präparaten können Immunfärbungen zur weiteren Differenzierung angefertigt werden. Während bei den histologischen Proben weitere Schnitte hergestellt werden, werden bei den zytologischen Präparaten die Immunfärbungen an Schnitten der entsprechenden zytologischen Histogelblöcken durchgeführt.

Im Allgemeinen wird ein Panzytokeratinantikörper (z. B. AE1/3) verwendet, um den epithelialen Ursprung einer Neoplasie nachzuweisen [38].

Zur weiteren Differenzierung wird standardmäßig bei jedem Präparat mit Verdacht auf einen malignen nicht kleinzelligen Tumor je ein Marker mit Anfärbbarkeit für Plattenepithelkarzinome und ein Marker für Adenokarzinome angewandt [29].

Die typische Kombination für Adenokarzinome stellt die positive Anfärbung von TTF-1 (Abbildung 01) und Napsin A dar [29,30,38], bei Plattenepithelkarzinomen zeigen sich spezifische Anfärbungen mit den Antikörpern gegen CK5/6 und p40/p63 (Abbildung 02) [30]. Ein neuroendokriner Ursprung der Tumorzellen kann mit Antikörpern gegen CD56, Chromogranin A und Synaptophysin nachgewiesen werden [40].

Um eine Aussage über die Proliferation des malignen Tumors treffen zu können, wird häufig eine Färbung mit Ki67 angewandt (Abbildung 04). Ki67 dient somit als Marker der Wachstumsfraktion eines Tumors [44]. Adenokarzinome zeigen dabei mit einer durchschnittlichen Wachstumsfraktion von 25,8% die niedrigste Proliferationsrate, Plattenepithelkarzinomen mit durchschnittlich 52,8% eine deutlich höhere Rate [52]. Bei den SCLC ist die Proliferationsrate am höchsten und liegt häufig zwischen ca. 64% und 77,5%, kann jedoch bis zu 100% erreichen [29,36].

Daher ist es ein besonders wichtiges Ziel insbesondere die sehr aggressiven SCLC mit hoher Treffsicherheit und kurzer Diagnosezeit mit histologischen, zytologischen und immunologischen Methoden sicher zu erfassen.

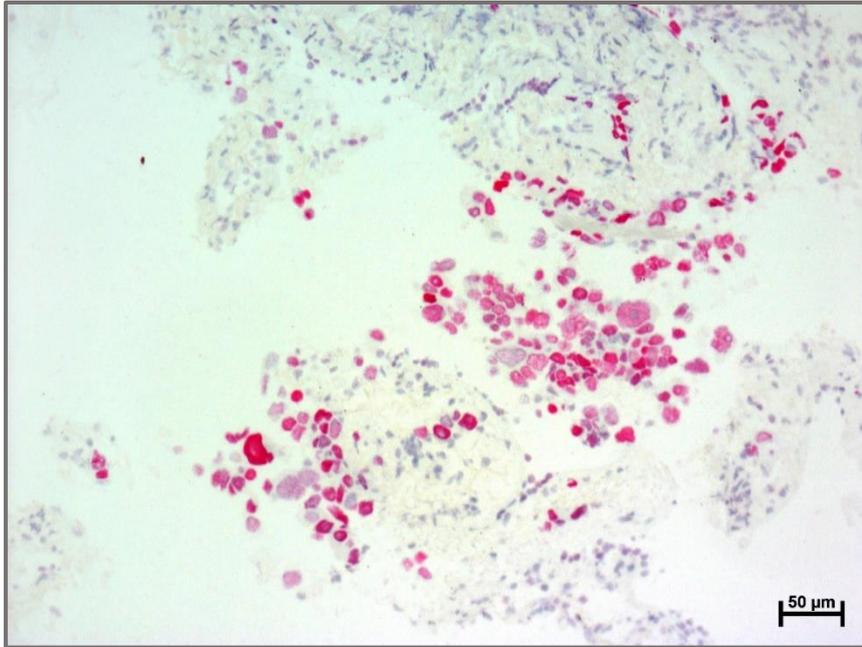


Abbildung 01: TTF-1-positive Infiltrate eines Adenokarzinoms (Histologie)

Mittelgroße, teils zu kleinen Verbänden zusammengelegene Zellen mit Anisonukleosen und nukleärer Immunreaktivität für TTF-1. Biopsie von Lungengewebe, Immunf. gegen TTF-1, Originalvergrößerung x20

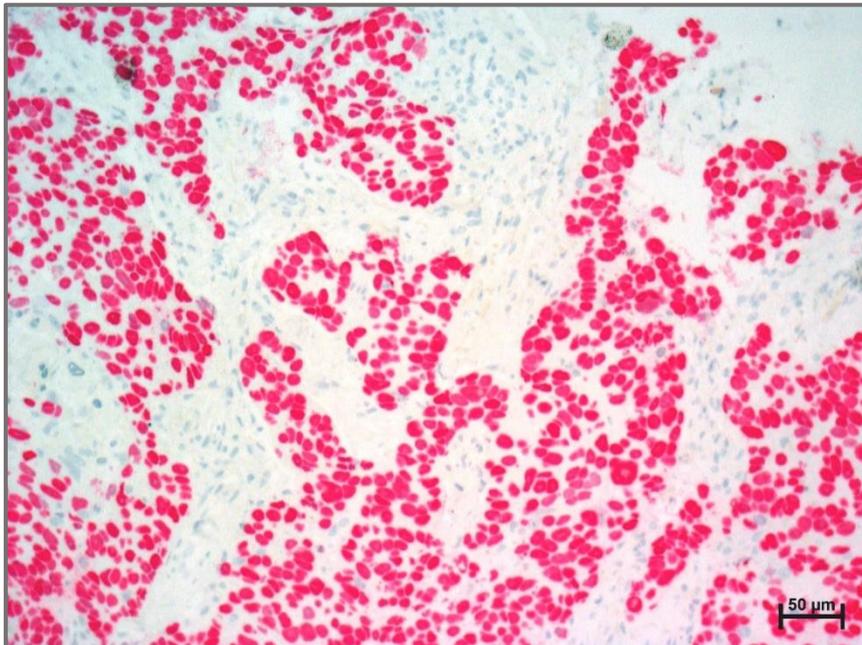


Abbildung 02: p40-positive Infiltrate eines Plattenepithelkarzinoms (Histologie)

Infiltrate einer mittelgroßen epithelialen Neoplasie mit solidem Wachstum und nukleärer Immunreaktivität für p40. Biopsie von Lungengewebe, Immunf. gegen p40, Originalvergrößerung x20

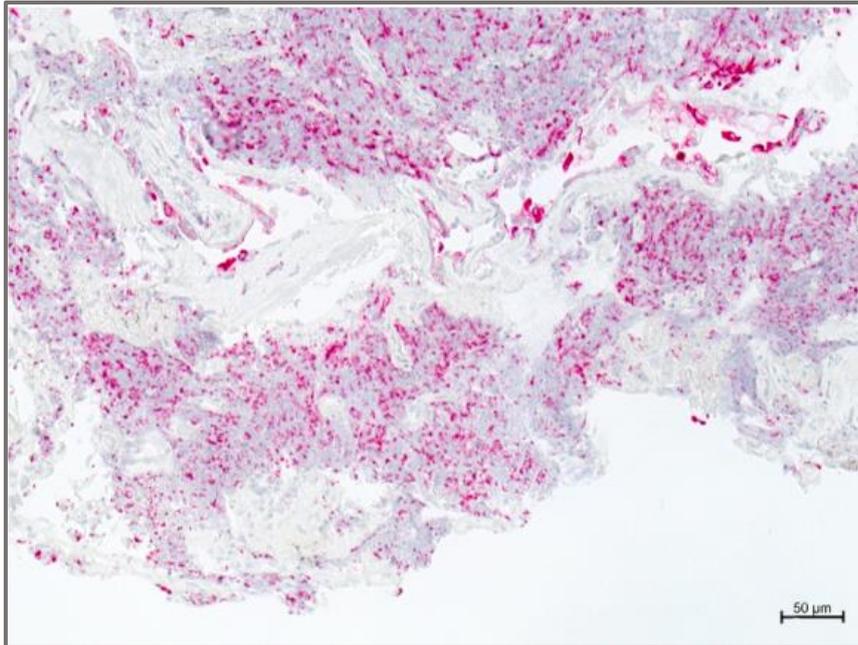


Abbildung 03: CK18-positive Infiltrate eines SCLC (Histologie)
 Infiltrate einer kleinzelligen Neoplasie, deren Tumorzellen zeigen ein schmales Zytoplasma und punktförmige zytoplasmatische Immunreaktivität für CK18.
 Biopsie von Lungengewebe, Immunf. gegen CK18 Originalvergrößerung x20

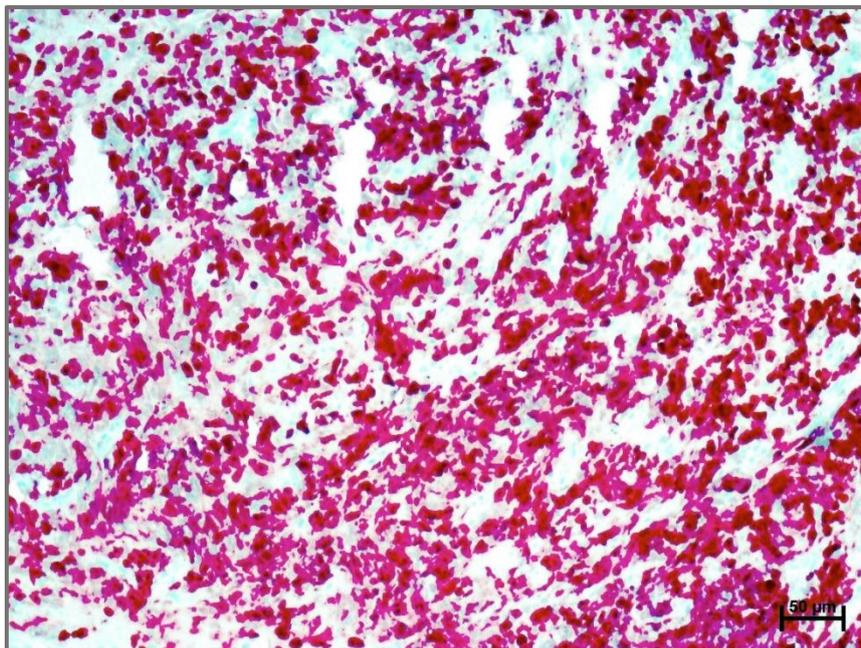


Abbildung 04: Proliferationsaktivität eines SCLC (Histologie)
 Infiltrate einer kleinzelligen Neoplasie mit hoher Wachstumsfraktion (>70%).
 Biopsie von Lungengewebe, Immunf. gegen Ki67, Originalvergrößerung x20

3 Fragestellung und Zielsetzung

Durch diese Arbeit wird ein Verfahren zur Diagnostik von Bronchialkarzinomen betrachtet. Die Wertigkeit der zytologischen Überstandsdiagnostik wird retrospektiv an 564 Fällen von Lungenbiopsaten mit Verdacht auf einen malignen Tumor aus dem Universitätsklinikum des Saarlandes aus dem Zeitraum von 2015 bis 2018 untersucht.

Dabei werden folgende Fragestellungen exploriert:

- Durch welche klinisch-pathologischen Standardparameter (Geschlecht, Alter bei Biopsieentnahme, Lokalisation der Probeentnahme, Grading, Diagnose) ist das vorliegende Kollektiv charakterisiert?
- Durch welche Einteilung können die Befunde adäquat und vergleichbar kategorisiert werden?
- Wie kann der maligne Tumor bei einer Tumordiagnose unterteilt werden?
- Welche Rolle in der Tumordiagnostik spielen die entsprechenden Immun- und Spezialfärbungen?
- Ermöglicht eine der beiden zytologischen Aufarbeitungsmethoden des Überstandes (Zytoprinpräparat oder zytologischer Histogelblock) eine gezieltere Tumordiagnostik?
- Ist die Überstandszytologie mit der Diagnostik an histologischem Biopsatgewebe vergleichbar?
- Zeigt eines der beiden Verfahren einen Vorteil bei verschiedenen Lokalisationen, Grading oder Tumortypen?
- Welche Vor- oder Nachteile birgt die Überstandsdiagnostik für den Patienten?

4 Material und Methodik

4.1 Material

4.1.1 Patientenkollektiv

Das Kollektiv bestand aus 564 zweifelhaften, verdächtigen und positiven Proben (Zeitraum 2015-2018) von Patienten mit klinischem Verdacht auf einen malignen Lungentumor.

Bei den Patienten handelte es sich ausschließlich um Patienten, die in der Klinik für Innere Medizin V – Pneumologie, Allergologie, Beatmungs- und Umweltmedizin des UKS behandelt wurden. Die entnommenen Proben umfassen bronchiale und transbronchiale Zangenbiopsien, die in Kombination mit ihrer Überstandsflüssigkeit (fixativ) aufgearbeitet wurden.

Zur Befundauswertung wurden die pathologischen Befunde, die Untersuchungsberichte und die Ergebnisse der Nachmikroskopie herangezogen.

4.1.2 Probenmaterial

Das Probenmaterial wurde von der Klinik für Innere Medizin V – Pneumologie, Allergologie, Beatmungs- und Umweltmedizin des UKS im Rahmen einer Bronchoskopie entnommen und zeitnah an das Institut für Pathologie des UKS überbracht.

Dort wurden die Proben im zytologischen Labor gemäß einem festgelegten Protokoll aufgearbeitet, um die entsprechenden Präparate der Biopsien und der zytologischen Überstände zu erhalten.

Die Diagnose und Befundung erfolgte durch Fachärzte des Instituts für Pathologie an Standard-HE-Präparaten und den entsprechenden Immunfärbungen.

Die Karzinome wurden histologisch nach der WHO Klassifikation von 2021 bewertet und einheitlich in die Gradingstufen eingeteilt [29].

Folgende Geräte, Materialien, Reagenzien und EDV-Programme (Tabelle 01/02/03) wurden verwendet:

4.1.3 Geräte und Materialien

Produkt	Produktname	Unternehmen, Unternehmenssitz
Cytofunnel	Thermo Scientific Shandon EZ Double Cytofunnel with White Filter Cards	Thermo Fisher Scientific, Runcorn, Vereinigtes Königreich
Deckglas	Deckglas	MEDITE GmbH, Burgdorf, Deutschland
Einbettform	Tissue-Tek Edelstahl-Ausgießform	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande
Einbettkassette	Einbettkassette	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde, Deutschland
Eindeckautomat	Glaseindeckautomat CV5030	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Färbeautomat	Continuous Linear Stainer COT 20	MEDITE GmbH, Burgdorf, Deutschland
Filterpapier	Filterblock für Einbettkassetten	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde, Deutschland
Heizblock	Thermo Scientific Digitales Trockenbad/Heizblock, ,1-Blockaufbau, CN-, EU- und UK-Stecker, 200 - 240 V	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Kühlbank	Tissue-Tek TEC 5 Paraffinausgießkonsole	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande
Kühlschrank	Standkühlschrank KB 4310 Comfort BioFresh bluperformance	Liebherr-Hausgeräte Ochsenhausen GmbH, Ochsenhausen, Deutschland
Mikroskop	Axioskop 40	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Mikroskopkamera	AxioCam MRc5	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Mikrotom	pfm Rotary 3003	pfm medical ag, Köln, Deutschland
Pipette	Scientific Samco Transferpipette (Blood Bank), graduiert, 2ml	Thermo Fisher Scientific, Runcorn, Vereinigtes Königreich
Reagenzglas	Röhre 13ml, 100x16mm, PS	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Standard-HE-Objektträger	Mikroskopische Objektträger	MEDITE GmbH, Burgdorf, Deutschland

Produkt	Produktname	Unternehmen, Unternehmenssitz
Superfrostobjektträger	SuperFrost Plus Objektträger	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
Vakuuminfiltrationsautomat	Tissue-Tek VIP 6	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande
Vortex Mixer	Vibrofix VF1 Electronic	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Wärmeschrank ¹	Universalschrank U	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach Deutschland
Wärmeschrank ²	Trocken- und Wärmeschrank Avantgarde.line Serie ED, Modell 56	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge ³	CytoSpin 4 Zytozentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Runcorn, Vereinigtes Königreich
Zentrifuge ⁴	Thermo Scientific Heraeus Labofuge 400	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland

Tabelle 01: Geräte und Materialien

¹für Standard-HE-Objektträger verwendet; ²für Superfrostobjektträger verwendet; ³für Cytofunnel verwendet; ⁴für restlichen Überstand verwendet

4.1.4 Reagenzien

Produkt	Produktname	Unternehmen, Unternehmenssitz
Aqua dest.	Aqua	B. Braun AG, Sembach, Deutschland
Eosin	Eosin G-Lösung 0,5% wässrig	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol (99%)	Ethanol absolute	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA
Fixierspray	M-Fix Fixationsspray	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Formalin gepuffert	Formaldehyd-Lösung 4,0% neutral gepuffert	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
Hämatoxin	Haemalaun-Lösung sauer nach Mayer	Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland
Histogel	Thermo Scientific Richard-Allan Scientific HistoGel	Richard Ellen-Allan Scientific, Kalamazoo, Michigan, USA
Paraffin	Paraffin 54/56°	Engelbrecht Medizin- und Labortechnik GmbH, Edermünde, Deutschland
rote Tusche	Stempelfarbe Laco SF 30, rot	LACO Office Products Finke GmbH, Sottrum, Deutschland
Schnelleindeckmittel	Entellan New	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Xylol	Xylol Pharm. Helv VI	Aug. Hedinger GmbH & Co. KG, Stuttgart, Deutschland

Tabelle 02: Reagenzien

4.1.5 Verwendete EDV-Programme

Programm	Unternehmen, Unternehmenssitz	Art der Verwendung
dc-Pathos Version 9.3.4	dc-systeme, Heiligenhaus, Deutschland	Datengewinnung
IBM SPSS Statistics Version 25	International Business Machines Corporation, Armonk, USA	Dokumentation, Datenverarbeitung, Datenauswertung
Microsoft Excel 365 ProPlus	Microsoft Corporation, Redmond, USA	Dokumentation, Datenverarbeitung, Datenauswertung
Microsoft Word 365 ProPlus	Microsoft Corporation, Redmond, USA	Dokumentation, Datenverarbeitung, Datenauswertung
Zeiss ZEN 2.6 blue edition	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland	Fotografieren der Präparate
Zotero	Roy Rosenzweig Center for History and New Media der George Mason University, Washington DC, USA	Verwaltung der Literatur- und Bildquellen

Tabelle 03: EDV-Programme

4.2 Methodik

4.2.1 Probengewinnung durch Bronchoskopie

4.2.1.1 Indikationen

Zur Durchführung einer Bronchoskopie gibt es eine Anzahl unterschiedlicher Indikationen (Tabelle 04). Die häufigste Indikation ist die Tumordiagnostik.

Indikation	Anteil
Tumorverdacht und/oder tumorpositive Zytologie	23,5%
therapeutische Eingriffe	21,6%
Erregerdiagnostik	15,0%
unspezifische Symptome wie Hämoptysen, Husten, Lymphknotenvergrößerung	11,8%
unklares Infiltrat	9,5%
interstitielle Erkrankung (unter anderem Sarkoidose)	5,2%
sonstige Indikationen	2,4%
Nachsorge	2,0%

Tabelle 04: Indikationen zur Bronchoskopie

modifiziert nach J. Nakhosteen et al., 2009 [32]

Indikationen zur Bronchoskopie in den Augusta-Kranken-Anstalten im Jahr 2007, Bochum

Das Hauptinstrument für eine Bronchoskopie ist das Bronchoskop. Dabei unterscheidet man starre und flexible Bronchoskope. Zur Tumordiagnostik werden vor allem flexible Bronchoskope eingesetzt, da sie über Seilzüge abknickbar und dadurch beweglicher sind.

Ein flexibles Bronchoskop besteht aus einer Kontrolleinheit mit Griff und einem langen Schlauch, welcher oral oder nasal in den Patienten eingeführt wird. Von der Kontrolleinheit bis zur distalen Spitze des Bronchoskops verlaufen Glasfasern, die Licht zur Beleuchtung der Bronchien leiten und die aufgenommenen Bilder übertragen. Mit Hilfe der Kontrolleinheit kann das Bildmaterial auf einen Bildschirm gesendet werden.

Des Weiteren umfasst ein Bronchoskop auch einen oder mehrere Arbeitskanäle. Diese Kanäle können zum Absaugen genutzt werden oder um Instrumente, wie Biopsiezangen, einzuführen [32].

Nach einer lokalen Anästhesie kann das Bronchoskop eingeführt und durch die Stimmlippen in das Bronchialsystem eingebracht werden. Durch die bewegliche Spitze des flexiblen Bronchoskops können nun die segmentalen und subsegmentalen Bronchien beurteilt werden.

Sollten suspekte Stellen gefunden werden, erfolgt eine Probeentnahme. Um eine Verfälschung von BAL oder BRAS zu verhindern, sollten diese, weniger invasiven Probeentnahmen zuerst erfolgen und erst danach z. B. eine Zangenbiopsie durchgeführt werden [32].

4.2.1.2 Bronchialaspirat

Zur Gewinnung von Bronchialaspirat wird Bronchialsekret über das Bronchoskop abgesaugt und in ein entsprechendes Probengefäß gegeben.

Bei Bronchialsekret handelt es sich vor allem um Sekret der Bronchialdrüsen und Becherzellen der Lunge. Es dient zur Reinigung und Befeuchtung des Bronchialsystems. Des Weiteren weist es auch antibakterielle Wirkungen auf [21].

Bei einem tumorösen Befund kann es abgeschilferte Tumorzellen enthalten.

Durch die bronchoskopische Gewinnung können Verunreinigungen der oralen Flora reduziert und somit die Probenqualität im Vergleich zu einer Sputumprobe gesteigert werden.

4.2.1.3 Bronchoalveoläre Lavage

Für eine bronchoalveoläre Lavage wird das Bronchoskop so tief wie möglich in einen Segmentbronchus eingebracht. Anschließend wird Kochsalzlösung in den Bronchus injiziert und wieder abgesaugt. Die so gewonnene Flüssigkeit wird in ein Gefäß gegeben und zur zytologischen Aufarbeitung eingesandt [32].

4.2.1.4 Endobronchiale Ultraschalluntersuchung

Bei der endobronchialen Ultraschalluntersuchung mit Führungskatheter (EBUS) handelt es sich um ein Endoskop mit einem kleinen Ultraschallkopf an der Spitze. Das Ultraschallbild zeigt die Peribronchialstrukturen, wodurch das Aufsuchen von Lymphknoten z. B. zur adäquaten Biopsieentnahme erleichtert wird. Mit einer Punktionsnadel kann dann die entsprechende Struktur auch biopsiert werden [32].

4.2.1.5 Bronchiale Biopsie

Die durch den Arbeitskanal eingeführte Biopsiezange wird an der zu untersuchenden Stelle ausgerichtet. Nun wird die geöffnete Zange in das Gewebe gedrückt und geschlossen. Durch mechanischen Zug wird das Gewebe aus der Bronchuswand entnommen und in Formalin eingelegt. Es sollten mehrere Biopsien entnommen werden, um die Treffsicherheit zu erhöhen [32].

4.2.1.6 Transbronchiale Biopsie

Die transbronchiale Biopsie (TBB) ist ebenfalls ein Verfahren zur Tumordiagnostik. Dabei wird das zu biopsierende Areal lokalisiert und die Zange ca. 2 cm vor der Entnahmestelle in Position gebracht. Dies kann durch eine Bildgebung bestätigt werden. Der Patient muss nun tief einatmen. Währenddessen wird die Zange vorgeschoben und geschlossen. Wurde das ge-

wünschte Gewebe erfasst, wird die Zunge mit einem Ruck zurückgezogen und das gewonnene Gewebe, wie bei der bronchialen Biopsie, in Formalin eingelegt. Auch hierbei sollten mehrere Proben entnommen werden [32].

4.2.1.7 Grenzen der Bronchoskopie

Für die Bronchoskopie gibt es relative Kontraindikationen, bei denen von dieser Untersuchung abgeraten wird. Dazu gehören: ein frischer Herzinfarkt, die Zeit vier Wochen danach und manifeste respiratorische oder kardiale Dekompensationen. Überdies sollte darauf geachtet werden, dass die Patienten über eine ausreichend gute Gerinnung verfügen [32].

Außer den patientenbedingten Limitierungen für diese Untersuchungsmethode müssen auch technische Aspekte beachtet werden. Nicht alle Tumore der Lunge sind mit dem Bronchoskop zugänglich. Die meisten gängigen Bronchoskope haben einen Außendurchmesser von 5-6 mm und dadurch können mit ihnen nur Bronchien bis zur 3.-5. Aufzweigung betrachtet werden. Es gibt noch dünnere Bronchoskope, jedoch haben diese einen sehr kleinen Arbeitskanal, was die Biopsieentnahme und die Manövrierfähigkeit der Bronchoskope erheblich einschränkt [51].

Großen Einfluss auf das Ergebnis hat auch die Erfahrung und Geschicklichkeit des biopsierenden Arztes [51].

4.2.2 Herstellung der Präparate

4.2.2.1 Vorbereitung

Die in der Klinik für Pneumologie, Allergologie, Beatmungs- und Umweltmedizin des UKS entnommenen Biopsien werden in kleinen, mit gepuffertem Formalin gefüllten Gefäßen und dem entsprechenden Einsendeschein mit zusätzlichen klinischen Informationen in das Labor des Instituts für Pathologie in Homburg (Saar) gebracht. Meist wird BRAS- und BAL-Material in der gleichen Sitzung entnommen und ebenfalls an die Pathologie übergeben, wo es zytologisch aufgearbeitet wird.

Zu Beginn wird die Probe mit zwei Identifikationsnummern versehen, eine für den Überstand und eine für die entsprechende Biopsie. Anschließend wird die Probe von einer medizintechnischen Angestellten (MTA) makroskopisch begutachtet und beschrieben.

Als weitere Vorbereitung werden ein Cytofunnel (wird zur Zentrifugation der Proben benötigt), zwei Einbettungskapseln, drei Standard-HE- und sechs Superfrostobjektträger mit der entsprechenden Identifikationsnummer beschriftet. Die Superfrostobjektträger werden für eventuell folgende Immunfärbungen benötigt und vorsorglich als sogenannte „Leerschnitte“ mit hergestellt, um bei Bedarf einer Spezialfärbungen eine zeitgerechte Befundung zu garantieren.

4.2.2.2 Übersicht über die Verarbeitung des eingesandten Probenmaterials

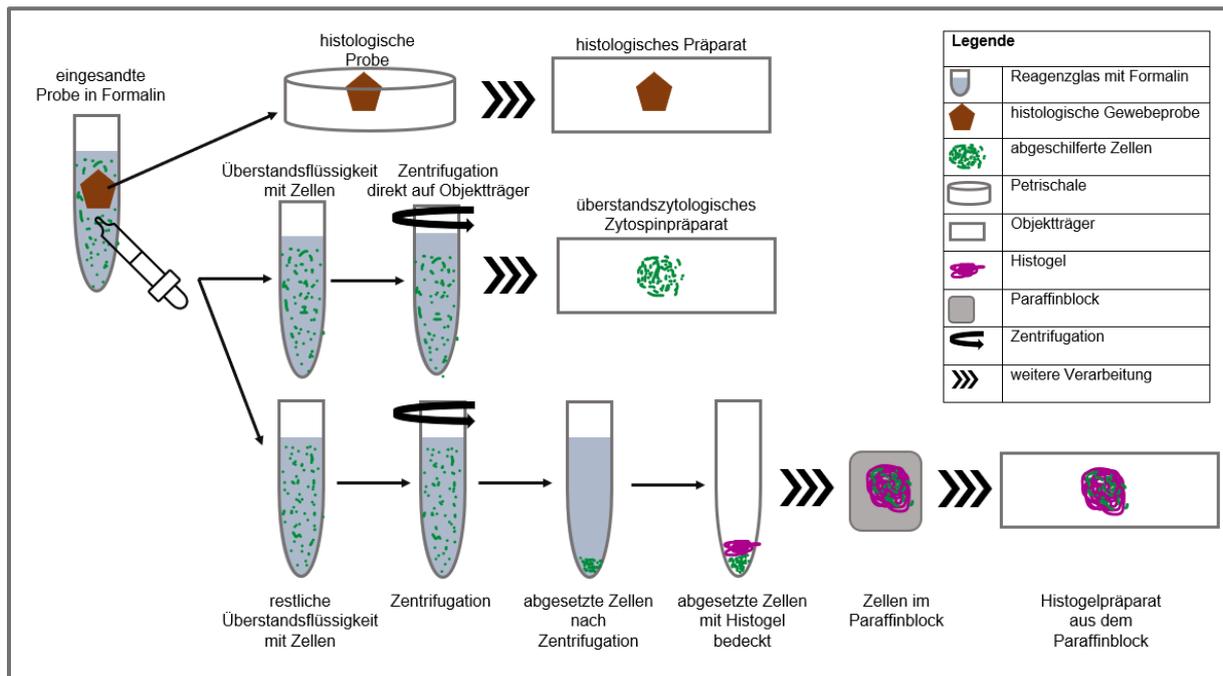


Abbildung 05: Schematische Darstellung der Verarbeitung des eingesandten Probenmaterials

Die Verarbeitung der eingesandten Proben erfolgt in drei Varianten (Abbildung 05). Zum einen erfolgt eine histologische Aufarbeitung. Zum anderen erfolgt die Aufarbeitung des Überstandes als Zytospinpräparat und als Histogelblock.

4.2.2.3 Abtrennung des Überstandes

Am Anfang dieses Arbeitsabschnittes wird die Flüssigkeit aus dem Probengefäß vorsichtig abpipettiert und in ein Reagenzglas umgefüllt. Dabei ist es wichtig, möglichst dicht neben den Biopsien abzupipettieren, um ein Maximum an abgeschilferten Zellen zu gewinnen. Hierbei wird darauf geachtet, dass die Gewebestücke nicht eingesaugt werden. Über die im Gefäß verbliebenen Gewebestücke wird erneut Formalin gegossen, um sie für die weitere Bearbeitung ausreichend zu fixieren.

Der gewonnene Überstand wird nun mit Hilfe zweier unterschiedlicher Methoden aufgearbeitet, die im Folgenden beschrieben werden.

4.2.2.4 Zytospinpräparat

Von der Überstandsflüssigkeit in dem Reagenzglas werden nun ca. 100-200 µl in den Cytotunnel pipettiert und dabei gleichmäßig auf die beiden Kammern des Cytotunnels aufgeteilt. Der befüllte Cytotunnel wird nun für 10 min bei 1 000 rpm zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wird der Objektträger aus dem Cytofunnel entnommen und sprayfixiert. Ist das Fixierspray ausreichend getrocknet, erfolgt die Färbung.

Dafür wird das Präparat in einen Färbeautomaten gehängt, welcher folgende Bäder enthält (in dieser Reihenfolge): 3x Hämatoxylin, 2x Eosin, 2x warmes Aqua dest., 3x 99%-Ethanol und 3x Xylol. Das Präparat verbleibt jeweils für 90 s in den oben aufgeführten Lösungen.

Das fertig gefärbte Präparat wird in den Eindeckautomaten gelegt und mit einem Deckglas versehen.

Zuletzt wird das eingedeckte Präparat noch vorsichtig abgetrocknet.

4.2.2.5 Histogelblock

Die restliche Überstandsflüssigkeit wird in dem Reagenzglas ebenfalls in eine Zentrifuge eingesetzt und bei 2 500 rpm für 7 min zentrifugiert. Danach wird die Flüssigkeit abgegossen, dabei bleiben die abzentrifugierten Zellen am Boden des Reagenzglases zurück. Nun wird in das Reagenzglas ca. 500 µl des flüssigen Histogels gegeben, welches zuvor mit Hilfe eines Heizblocks auf ca. 75 °C erhitzt wird. Um die Zellen in dem Histogel gut zu verteilen, wird der Inhalt des Reagenzglases mit einem Vortexmischer gemischt. Im nächsten Schritt kommt das Reagenzglas für 10 min in den Kühlschrank.

Nachdem sich das Histogel abgekühlt und somit wieder verfestigt hat, wird es durch kurzes, ruckartiges Klopfen auf den Tisch vom Reagenzglas abgelöst und in eine der bereits beschrifteten Kapseln gegeben. Diese Kapsel wird in 99%-Ethanol mit roter Tusche gelagert bis der Vakuumfiltrationsautomat gestartet wird. Dort bleibt die Kapsel für 14 h, meist über Nacht und wandert für je 60 min pro Bad durch 8 Bäder: 99%-Alkohol, 3 Bäder Xylol und 4 Bäder Paraffin. Nach Ablauf dieser Zeit werden die Kapseln entnommen. Der Inhalt der Kapsel wird in eine Einbettform gegeben, welche anschließend mit Paraffin gefüllt wird. Die Einbettform wird nun auf die Kühlbank gestellt, wo sich das Paraffin verfestigt.

Der nun fertige Paraffinblock wird mit dem Mikrotom in ca. 1 µm dünne Schichten geschnitten und anschließend auf einen der Objektträger aufgebracht. Das übrige Material des Paraffinblocks wird in das Archiv zur Aufbewahrung geben und steht so für eventuell benötigte weiterführende Immunfärbungen oder Untersuchungen bereit.

Die Objektträger für die HE-Färbung werden dann zum sogenannten Abschmelzen für 10 min bei 90 °C im Wärmeschrank erhitzt, während die Superfrostobjektträger für 10 min bei 60 °C erhitzt werden.

Die Objektträger für die HE-Färbung werden im Färbeautomaten in folgenden Bädern für je 90 s gefärbt: 3 Bäder Xylol, 7 Bäder 99%-Alkohol, 3 Bäder Xylol und 4 Bäder Paraffin. Abschließend werden sie eingedeckt.

4.2.2.6 BRAS

Die Aufarbeitung des BRAS erfolgt in zwei Varianten. Zum einen erfolgt eine Aufarbeitung von BRAS analog zu Histogelblöcken der Überstände.

Zum anderen erfolgt eine Aufarbeitung zu einem Paraffinblock ohne Histogel. Dafür wird das BRAS-Material nach der Zentrifugation mit einem Spatel auf ein Filterpapier übertragen und über Nacht in eine Einbettkassette und gepuffertes Formalin gegeben. Im Verlauf werden die getrockneten Zellen von dem Filterpapier geschabt und ohne Histogel analog zu der oben beschriebenen Methode in Paraffin eingebettet und geschnitten.

4.2.2.7 Biopsien

Um eine standardisierte Fixierung zu erreichen, werden die Proben pro Millimeter Gewebe für 1h in gepuffertem 4% Formalin fixiert und anschließend in vorbereitete Kapseln gegeben, die zuvor noch mit einem Stück Filterpapier ausgekleidet werden, um einen Materialverlust durch Ausschwemmen zu vermeiden. Anschließend werden die Kapseln in den Vakuuminfiltrationsautomaten gebracht. Das weitere Verfahren entspricht dem der Herstellung des zytologischen Histogelblocks.

4.2.3 Befundung und Archivierung

Nach abgeschlossener Aufarbeitung und Befundung der Biopsat- und Überstandspräparate durch die Fachärzte des Instituts für Pathologie des UKS werden diese im Archiv des Instituts registriert und gelagert.

4.2.4 Auswertung der pathologischen Befunde

4.2.4.1 Aufbau der Befunde

Vom zytologischen und histologischen Material wurden jeweils separate schriftliche Befunde erstellt. Es lag jeweils mindestens ein Zytospinpräparat zur Beurteilung vor.

Die Routineauswertung der BRAS-Befunde erfolgte getrennt von denen der Überstandszytologie, jedoch nach den gleichen Kriterien. Hierbei wurde bei den Proben in den Jahren 2010/2011 je ein Schnitt des Paraffinblocks, bzw. aus den Jahren 2015-2018 je ein Schnitt des Histogelblocks betrachtet.

4.2.4.2 Normalbefund einer Überstandszytologie

Die zytologischen Diagnoseverfahren wie BAL/BRAS sind inzwischen in der Tumordiagnostik etabliert und zeigen eine gute Treffsicherheit. Zytologische Proben werden auch als Diagnosemöglichkeit in der S3-Leitlinie aufgeführt [2].

Aufgrund der Ähnlichkeit des zugrundeliegenden Materials der Überstandszytologie wird der Befund analog zu den beiden oben genannten, etablierten zytologischen Verfahren erhoben. So lassen sich in einem unauffälligen zytologischen Befund physiologisch in der Lunge vorkommende Zellen finden (Abbildung 06/07): Zylinderepithelien, Flimmerepithelien, Basalzellen, Becherzellen, einzelne Alveolarmakrophagen und Blutbestandteile. Die beschriebenen Zellen zeigen keine Auffälligkeiten in Bezug auf den Nukleus, das Zytoplasma, die Zellgröße und -form. Bei einer gesunden Lunge lassen sich außerdem auch nur wenige Entzündungszellen, wie Makrophagen, Leukozyten, vor allem neutrophile Granulozyten und Lymphozyten, finden [14].

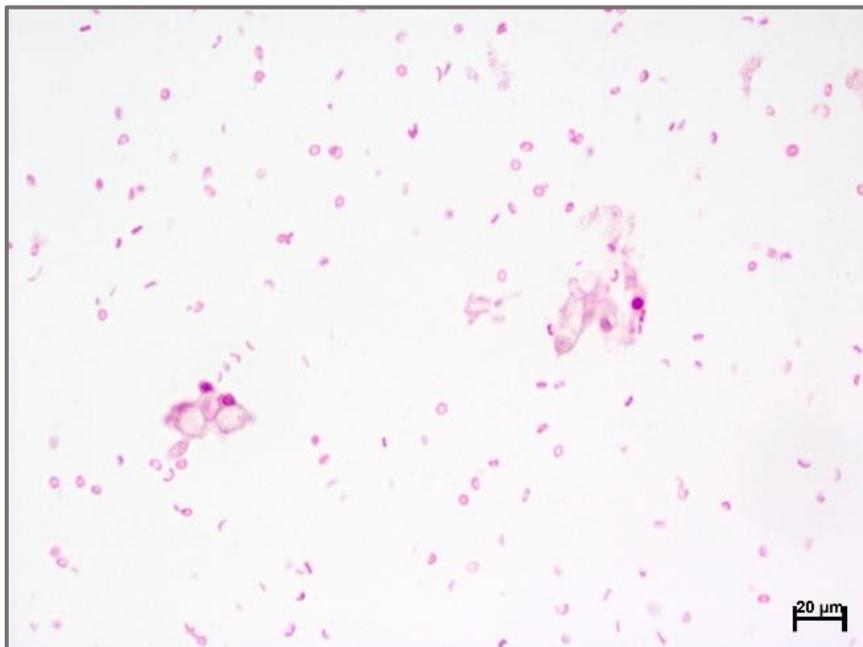


Abbildung 06: Negativer Befund (Überstandszytologie - Histogelblock)

Nachweis von einzelnen Becherzellen, histiozytären Zellen sowie Erythrozyten.

Zytologie der Lunge, HE-Färbung, Originalvergrößerung x40

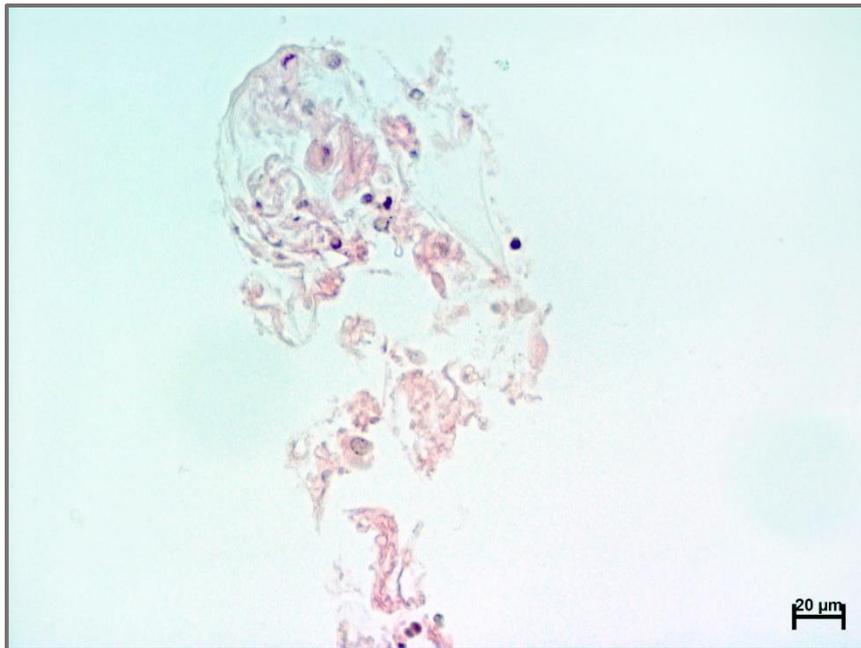


Abbildung 07: Negativer Befund (BRAS - Histogelblock)
Nachweis von Zylinderepithelien, Lymphozyten und kernlosen Zellelementen ohne Hinweise auf Zellatypien.
Zytologie der Lunge, HE-Färbung, Originalvergrößerung x40

4.2.4.3 Kriterien für die Auswertung

4.2.4.3.1 Typisierung

Anhand der Befunde werden die malignen Tumore in mehrere Kategorien und Subtypen unterteilt. Dabei wird eine Einteilung entlang den WHO-Gruppen vorgenommen [29].

Alle malignen Tumore, die in keine der in Abbildung 08 aufgeführten Subgruppen des Karzinoms eingeordnet werden können, werden der Gruppe „Sonstige maligne Tumore“ zugeordnet. Darunter fallen Metastasen nicht pulmonalen Ursprungs, adenosquamöse Karzinome, kombinierte kleinzellige Karzinome, basaloide Plattenepithelkarzinome, Lymphome, Karzinoide, Melanome, Riesenzellkarzinome, großzellige Karzinome, pleomorphe Karzinome, adeno- idzystische Karzinome, neuroendokrine und nekrotische Tumore.

Im späteren Verlauf der Arbeit werden zur vereinfachten Auswertung nur die Gruppen „Adenokarzinom“, „Plattenepithelkarzinom“ und „SCLC“ betrachtet und die übrigen, wie NSCLC-NOS (NSCLC- not otherwise specified), etc. ebenfalls in der Gruppe „sonstige maligne Tumore“ zusammengefasst.

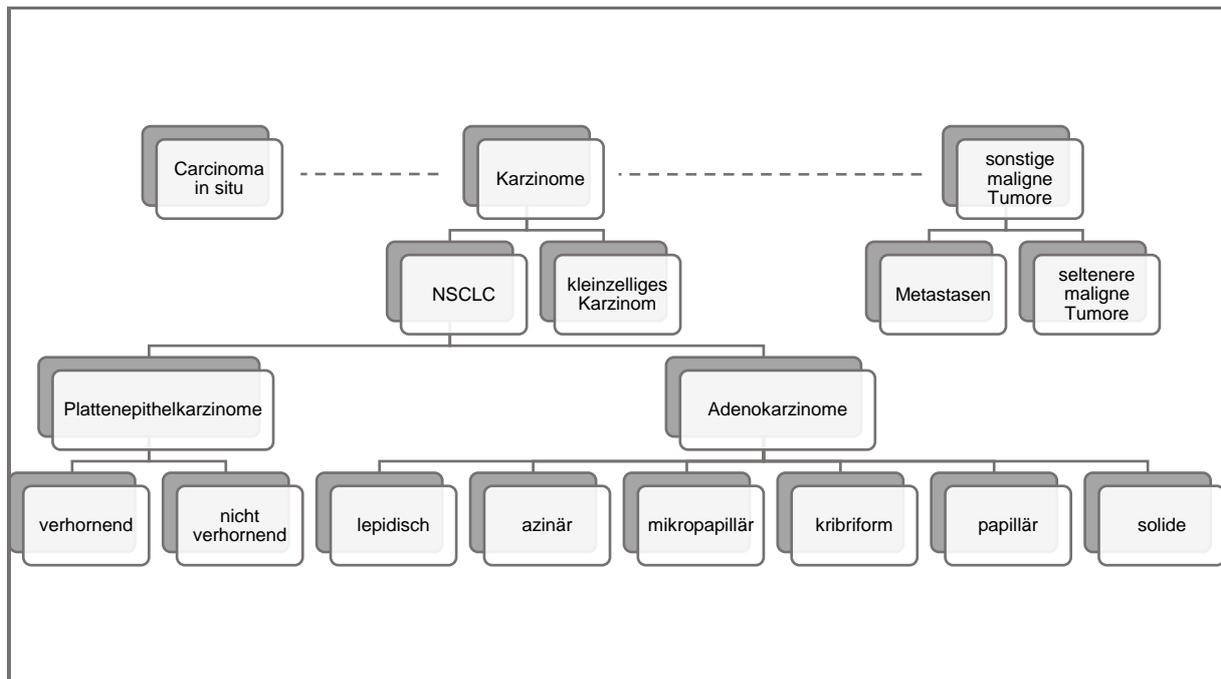


Abbildung 08: Einteilung in Tumorsubgruppen

Die Abbildung zeigt hier vorgenommene Einteilung in die Tumorsubtypen.

Ist eine Subtypisierung der NSCLC am HE-Präparat nicht möglich, werden meist weitere Immunfärbungen durchgeführt. Die weitere Klassifikation erfolgt dann nach der immunhistochemischen Typisierung von CK positiven, morphologisch nicht unterscheidbaren NSCLC der WHO Klassifikation in der 5. Auflage [29]. Die genaue Klassifikationstabelle findet sich im Anhang (Punkt 12.1).

4.2.4.3.2 Zytologische Kategorien

Für die Befunde der zytologischen Überstände wird von den Ärzten des Instituts für Pathologie des UKS eine fünfstufige Einteilung vorgenommen.

Kategorie	Erläuterung
negativ	kein maligner Tumor erkennbar (Abbildung 09)
zweifelhaft	wenige leichtgradig atypische Zellen; nicht durchschichtbare Aggregate (Abbildung 10)
verdächtig	auf Atypie verdächtige Zellgruppen mit mittelgradigen Veränderungen; Zellen mit Chromatinschlieren; Zellen mit mäßiggradig veränderten Zellkernen (Abbildung 11)
positiv	maligne Tumorzellen sicher erkennbar (Abbildung 12)
nicht repräsentativ	nicht ausreichend Zellmaterial vorhanden, Probe nicht bewertbar

Tabelle 05: Fünfstufige Einteilung der Befunde der Überstandspräparate
Stufen in aufsteigender Reihenfolge für die Diagnose eines malignen Tumors.

In den histologischen Befunden kann in fast allen Fällen eine eindeutige Diagnose zu „positiv“ oder „negativ“ gestellt werden. Bei unzureichender Qualität und Quantität der histologischen Befunde wurden die Kategorien „zweifelhaft“ und „verdächtig“ verwendet. Die Bewertung der Immunfärbungen erfolgte nach den gleichen Kriterien.

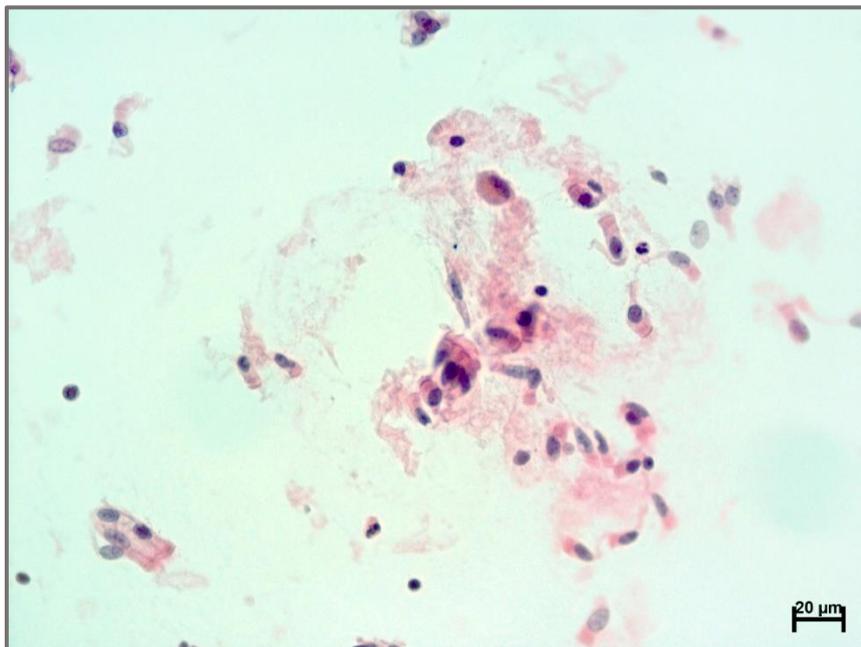


Abbildung 09: Negativer Befund (Überstandszytologie - Histogelblock)

Nachweis von kleinen Verbänden von Zylinderepithelien mit Flimmerhaarbesatz, Lymphozyten und histiozytären Zellen.
Zytologie der Lunge, HE-Färbung, Originalvergrößerung x40

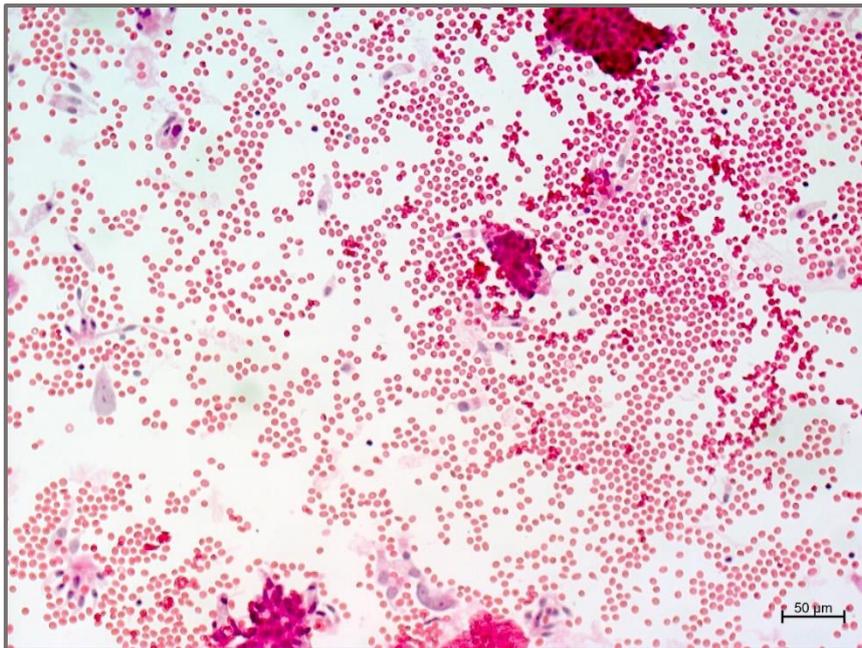


Abbildung 10: Zweifelhafter Befund (Überstandszytologie - Histogelblock)

Nachweis von reichlichen Erythrozyten, respiratorischen Epithelien sowie Verbände epitheloider Zellen, deren Zellgrenzen und Zellkernen nicht sicher beurteilbar sind.

Zytologie der Lunge, HE-Färbung, Originalvergrößerung x20

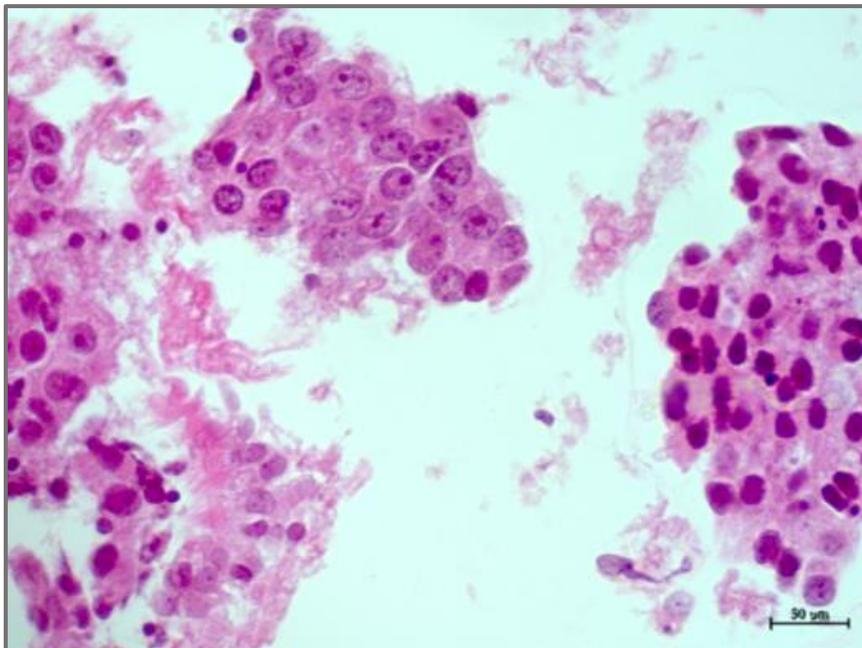


Abbildung 11: Verdächtiger Befund (Überstandszytologie - Histogelblock)

Nachweis von Verbänden mittelgroßer epithelialer Zellen mit deutlichen Zellkernatypien, verdächtig auf Zellmaterial eines NSCLC.

Zytologie der Lunge, HE-Färbung, Originalvergrößerung x40

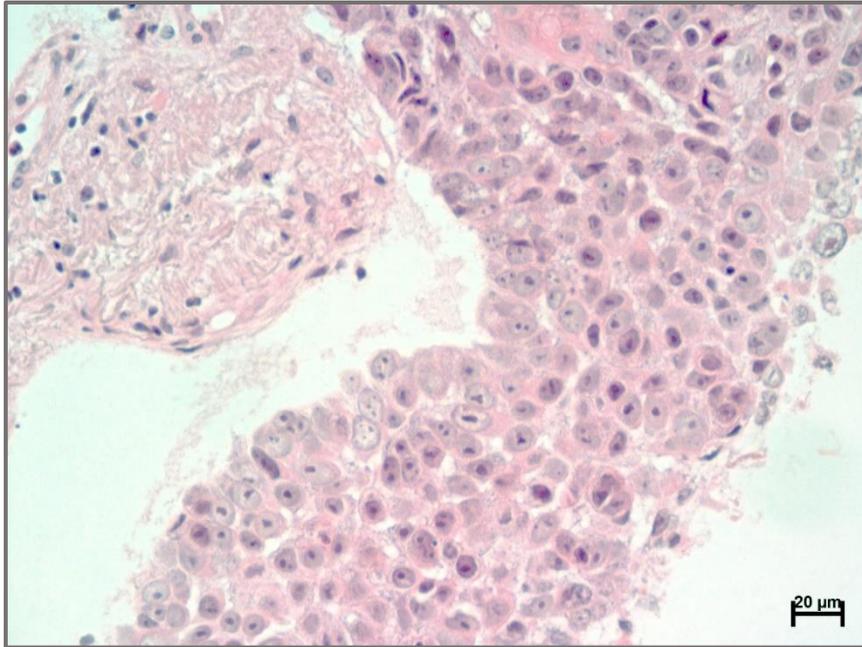


Abbildung 12: Zellen eines Plattenepithelkarzinoms (Überstandszytologie - Histogelblock)

Nachweis von Verbänden atypischer Epithelien mit Schichtungstendenz, miterfasst spärliches Tumorstroma.

Zytologie der Lunge, HE-Färbung, Originalvergrößerung x40

4.2.4.3.3 Grading

Bei ausreichender Quantität und Qualität der Probe wurde das Tumorigradung (Differenzierungsgrad) direkt im Befund angegeben. Da in einigen Befunden kein Grading beschrieben war, wurde dieses bei den fehlenden Fällen nach Möglichkeit nach den in Tabelle 06 und Tabelle 07 gezeigten Kriterien ergänzt. Das Grading wird dabei auf die Gewebeprobe bezogen. Da diese nur einen kleinen Ausschnitt des malignen Tumors repräsentiert kann bei einer Tumorsektion in einem anderen Tumoranteil eventuell noch ein anderes Grading gefunden werden.

Da kleinzellige Karzinome per definitionem „high-grade“-Tumore sind [23,29], wurde sie hinsichtlich ihres Differenzierungsgrad in die Gradinggruppe „G4“ eingeteilt.

Für Adenokarzinome liegen mehrere unterschiedliche Einteilungsschemata vor, von denen zwei in folgender Tabelle dargestellt sind. Für diese Arbeit wurde das Grading nach dem prädominanten Wachstumsmuster gewählt.

	prädominantes Wachstumsmuster des AC	schlechtestes Wachstumsmuster des AC
G1	lepidisch	nur lepidisch
G2	azinär, papillär	Anteil von azinär oder papillär, aber kein G3-Muster
G3	solide, mikropapillär, kribriform	Anteil von solide, mikropapillar oder kribriform

Tabelle 06: Grading von Adenokarzinomen

J. M. Boland et al., 2017; W. D. Travis et al., 2015 [8,49]

Auch für Plattenepithelkarzinome gibt es viele verschiedene Gradingssysteme. In dieser Arbeit wurde ein Grading verwendet, bei dem vor allem der Grad der Verhornung und die Anzahl der Interzellulärbrücken die Hauptrolle spielen.

	Einteilungskriterien der PEC
G1	ausgeprägte Verhornungen über den ganzen Tumor in Form von Hornperlen, gut erkennbare Interzellulärbrücken, palisadenartige Zellen am Tumorrand, gut definierte polygonale Zellformen
G2	geringe Verhornungen, wenige oder fehlende Hornperlen, schlecht erkennbare Interzellulärbrücken, palisadenartige Zellen am Tumorrand, gut definierte Zellgrenzen, zentrale komedoartige Nekrosen möglich
G3	keine bis maximal Einzelzellverhornung, sehr wenige bis keine Interzellulärbrücken, starke Kernpolymorphismen und -atypien, unregelmäßige Nekrosen möglich, schleimbildende Einzelzellen möglich

Tabelle 07: Grading von Plattenepithelkarzinomen

I. Damjanov et al., 2013 [19]

4.2.4.3.4 Lokalisation

Je nach Tumorlokalisierung müssen die entsprechenden Biopsieentnahmen an unterschiedlichen Stellen entnommen werden. Die Entnahmelokalisation wird auf dem Einsendeschein von dem biopsierenden Arzt der Klinik vermerkt.

Anhand dieser Angaben wurden die Lokalisationen für diese Arbeit in Gruppen eingeteilt: Trachea bis Hauptkarina, Hauptbronchus rechts, bzw. links und Segmentbronchien anhand den jeweiligen Lungenlappen.

Die Gruppen wurden für einige Auswertungen in zwei bzw. drei Gruppen zusammengefasst: „zentral“ (Trachea bis Hauptkarina, Hauptbronchus rechts, bzw. links) und peripher (rechte Lungenhälfte und linke Lungenhälfte).

4.2.4.3.5 Tumor in anderen Einsendungen

Bei Fällen, in denen kein maligner Tumor sicher diagnostiziert werden kann, das beste erreichte Ergebnis also „zweifelhaft“ oder „verdächtig“ ist, wird geschaut, ob in einer anderen Probe des gleichen Auftrags oder in einer anderen Einsendung ein maligner Tumor gefunden werden kann. Dabei werden alle Aufträge des Patienten innerhalb von 1 Jahr vor oder nach der entsprechenden Probeentnahme beachtet. Kann in den Daten des Instituts für Pathologie des UKS kein anderer positiver Auftrag gefunden werden, werden die betreffenden Patientendaten im klinischen Krebsregister in der Saarländische Krebszentrale – Tumorzentrum des UKS nachgeprüft.

Dabei werden Tumore der gleichen Lokalisation Tumoren anderer Lokalisationen gegenübergestellt.

4.2.5 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der Arbeit erfolgte mit der Software SPSS Statistics von IBM in der Version 25. Das Programm wurde vom Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik (IMBEI) der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes zur Verfügung gestellt.

Durch IMBEI erfolgt auch eine Beratung zur statistischen Auswertung. Ansprechpartnerin hierbei ist Frau Diplom-Statistikerin G. W..

Um Unterschiede und Zusammenhänge zwischen den Vergleichsgruppen nachzuweisen oder zu widerlegen, wird für die unverbundenen qualitativen Merkmale der Chi-Quadrat-Test oder der exakte Test nach Fisher verwendet. Verbundene qualitative Merkmale werden mit dem McNemar-Test geprüft.

Das Signifikanzniveau wird bei den verwendeten Tests auf 0,05 festgelegt. Der Signifikanzwert (p -Wert) wird dabei immer auf die dritte Nachkommastelle gerundet.

5 Ergebnisse

5.1 Klinisch-histopathologische Parameter des Kollektivs

Die Werte in den folgenden Punkten beziehen sich auf die Überstandszytologie und die entsprechende Histologie. Einzig Punkt 6.7 bezieht sich auf die Auswertung der BRAS-Proben, die dort separat aufgelistet werden.

Im Bereich der klinisch-pathologischen Parameter werden das Geschlecht, das Alter bei der Probeentnahme, die Lokalisation der Probeentnahme, das Grading und der histologische Subtyp des malignen Tumors betrachtet.

In der weiteren Auswertung wird geprüft, inwieweit die Überstandszytologie und die Histologie korrelieren. Überdies wird untersucht, ob Lokalisation und Grading einen Einfluss auf die Wertigkeit der Überstandszytologie haben.

5.1.1 Klinische Parameter des Kollektivs

Das zugrunde liegende Kollektiv von 564 Proben setzt sich aus 211 Proben (37,4%) von weiblichen Patienten und 353 Proben (62,6%) von männlichen Patienten zusammen.

Das Durchschnittsalter der Patienten zum Zeitpunkt der Probeentnahme liegt bei 65,29 Jahren. Frauen sind somit im Mittel mit 64,3 Jahren jünger als Männer mit einem durchschnittlichen Alter von 65,9 Jahren bei Entnahme.

5.1.2 Histopathologische Parameter des Kollektivs

Bei n=420 (74,5%) der 564 Proben kann durch die Zusammenschau der Überstandszytologie, der Histologie und unter Zuhilfenahme von Immunfärbungen valide ein maligner Tumor diagnostiziert werden. Von den 420 positiven Proben lassen sich in n=126 Fällen (30%) „Adenokarzinome“, in n=148 Fällen (35,2%) „Plattenepithelkarzinome“, in n=90 Fällen (21,4%) „kleinzellige Karzinome“, in n=48 Fällen (11,4%) „sonstige maligne Tumore“ diagnostizieren. Von diesen n=48 „sonstigen malignen Tumoren“ lassen sich n=21 als Metastasen identifizieren. Bei weiteren n=8 Fällen (1,9%) lässt sich die Diagnose eines „NSCLC-NOS“ stellen.

In n=125 Fällen wird die Diagnose mit „zweifelhaft“ und in n=8 Fällen mit „verdächtig“ beschrieben. Diese Befunde werden zwar als auffällig dargestellt, es lassen sich aber keine eindeutig malignen Tumore nachweisen. Abschließend sind noch n=10 „Carcinoma in situ“ als Präkanzerosen zu finden. Die Verteilung der Diagnosen ist in Abbildung 13 und Tabelle 08 dargestellt. Bei einem Fall wird durch die Immunfärbungen der zunächst bestehende Tumorverdacht widerlegt.

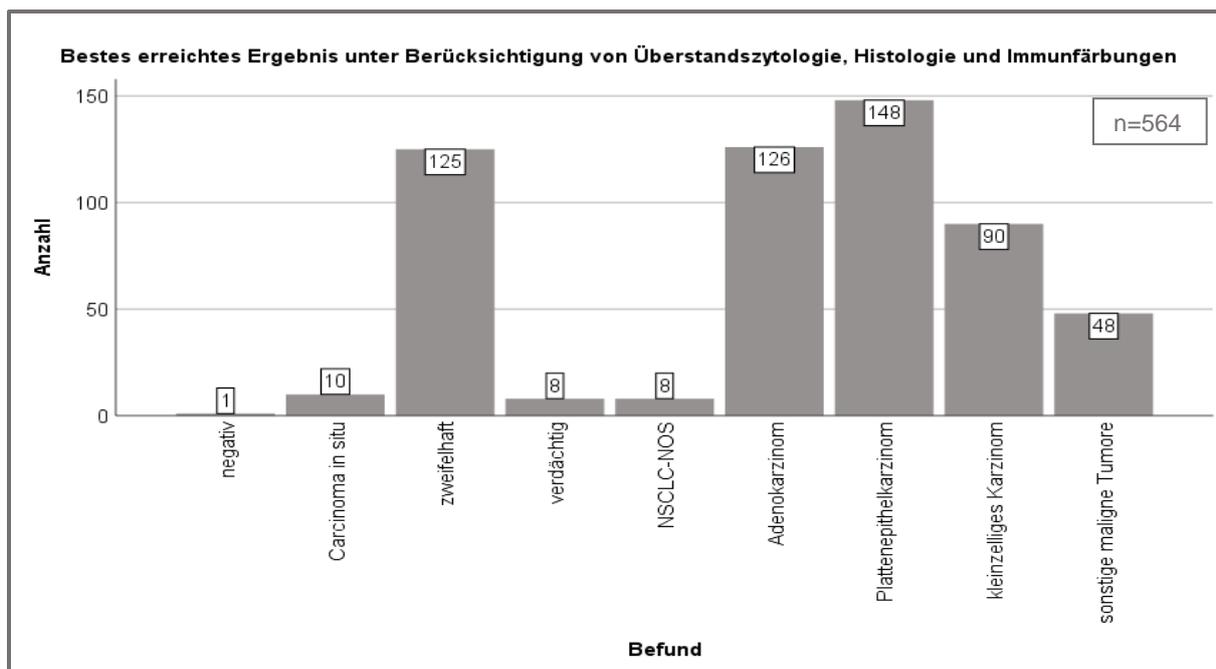


Abbildung 13: Häufigkeitsverteilung der endgültigen Diagnosestellung unter Berücksichtigung von Überstandszytologie, Histologie und Immunfärbungen

Das Diagramm zeigt die bestmöglichen Ergebnisse, die durch die HE-Färbung oder im Zusammenhänge mit den Immunfärbungen gestellt werden können. Es werden insgesamt n=564 Proben betrachtet.

Bestes erreichtes Ergebnis aus Überstandszyt./Histologie/Immunf.	abs. Anzahl (n)	rel. Häufigkeit (%)
negativ	1	0,2%
Carcinoma in situ	10	1,8%
zweifelhaft	125	22,2%
verdächtig	8	1,4%
NSCLC-NOS	8	1,4%
Adenokarzinome	126	22,3%
Plattenepithelkarzinome	148	26,2%
kleinzellige Karzinome	90	16,0%
sonstige maligne Tumore	48	8,5%
Gesamt positive Diagnosen	420	74,5%
Gesamt positive Diagnosen inkl. Carcinoma in situ	430	76,2%
Gesamt	564	100,0%

Tabelle 08: Häufigkeitsverteilung der endgültigen Diagnosestellung unter Berücksichtigung von Überstandszytologie, Histologie und Immunfärbungen

5.1.3 Lokalisationen der Probenentnahmen

Je nach Tumorverdacht erfolgt die gezielte Probeentnahme aus diesem Areal (Abbildung 14). Auf der rechten Lungenseite wurden mit $n=214$ Fällen (37,9%) häufiger Proben entnommen als auf der linken Seite mit $n=174$ Fällen (30,9%). Auch die zentralen Gruppen (links zentral, rechts zentral, Trachea bis Hauptkarina) machen zusammen mit $n=169$ Probenentnahmen (30,0%) einen großen Anteil aus.

1,2% ($n=7$) der Proben können nicht genau zugeordnet werden.

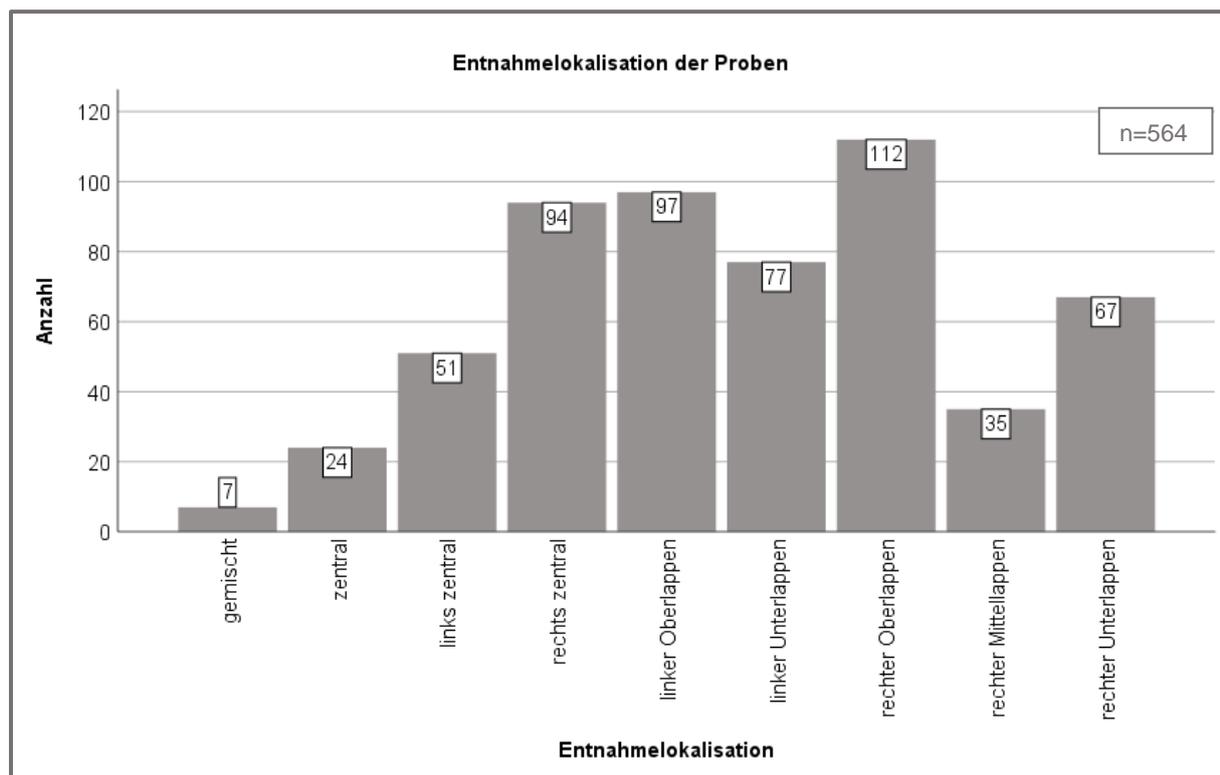


Abbildung 14: Häufigkeitsverteilung der Entnahmelokalisationen aller Proben

Das Diagramm zeigt die Verteilung der Anzahl an Probeentnahmen auf die verschiedenen Lokalisationen. Es werden insgesamt $n=564$ Proben zugeordnet.

5.1.3.1 Verteilung der Tumorsubtypen auf die unterschiedlichen Lokalisationen

Betrachtet man nur die diagnostizierten malignen Tumore inklusive Carcinoma in situ, ergibt sich eine charakteristische Verteilung der einzelnen Gruppen auf die unterschiedlichen Lokalisationen.

So zeigt sich, dass die Gruppe „Adenokarzinome“ mit 35,0% ($n=105$) den größten Teil der 300 malignen Tumore in der Lungenperipherie, also in den Lungenlappen, ausmacht.

„Plattenepithelkarzinome“ bilden hingegen mit einem Anteil von 44,8% ($n=56$) der 125 zentral wachsenden malignen Tumore den größten Anteil in den zentralen Bereichen. Auch die SCLC wachsen vermehrt zentral und bilden dabei einen Anteil von 26,4% ($n=33$) an den zentralen malignen Tumoren.

Die genaue Verteilung der Tumorsubtypen auf die Lokalisationen findet sich im Anhang.

5.1.4 Auswertung zum Grading

Insgesamt kann für $n=389$ Fälle der 420 positiven Diagnosen ein entsprechendes Grading bestimmt werden (Abbildung 15). In Fällen der Metastasen oder bei einigen selteneren Tumorsubtypen kann oder darf kein Grading erhoben werden.

In $n=5$ Fällen wird das Grading „G1“ festgelegt. Zu dieser Gruppe gehören $n=2$ lepidische Adenokarzinome, $n=2$ Karzinoide und $n=1$ adenoidzystisches Karzinom. In $n=70$ Fällen wird ein Grading von „G2“ bestimmt. In diese Gruppe fallen v. a. verhornende Plattenepithelkarzinome und azinäre Adenokarzinome, unterdessen überwiegen in der Gruppe „G3“ ($n=220$) un- verhornte Plattenepithelkarzinome und solide oder mikropapilläre Adenokarzinome. Bei dem Grading „G4“ ($n=94$) nehmen den größten Anteil die kleinzelligen Karzinome ein.

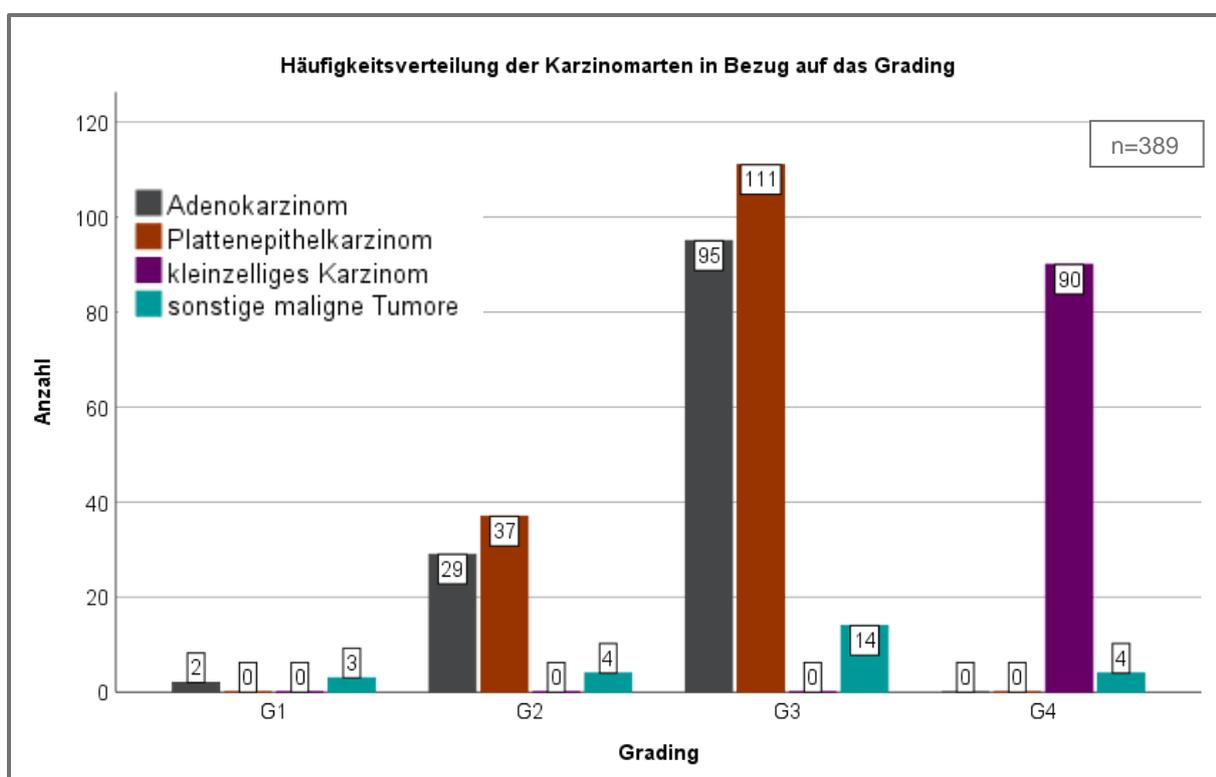


Abbildung 15: Häufigkeitsverteilung der Karzinomarten in Bezug auf das Grading
Das Diagramm zeigt die Zuordnung der Tumortypen zum jeweiligen Grading. Es werden insgesamt $n=389$ Proben zugeordnet.

5.2 Auswertung zu den einzelnen Tumorsubtypen bei der Histologie und der zytologischen Überstandsdiagnostik

5.2.1 Histologie ohne immunhistochemische Färbungen

Am histopathologischen Präparat lassen sich an den Tumorformationen Wachstumsmuster festlegen, anhand derer eine weitere Subtypisierung vorgenommen werden kann (Abbildung 16/17/18).

Die folgende Auswertung in die Subgruppen erfolgt an HE-Färbungen ohne Immunfärbungen. Anhand des Wachstumsmusters lassen sich die Adenokarzinome weiter in lepidische (n=4), azinäre (n=25), mikropapilläre (n=6), kribriforme (n=1) und solide (n=15) Gruppen einteilen (Tabelle 06), während man bei den Plattenepithelkarzinomen verhornte (n=45) und unverhornte (n=22) Plattenepithelkarzinome unterscheidet.

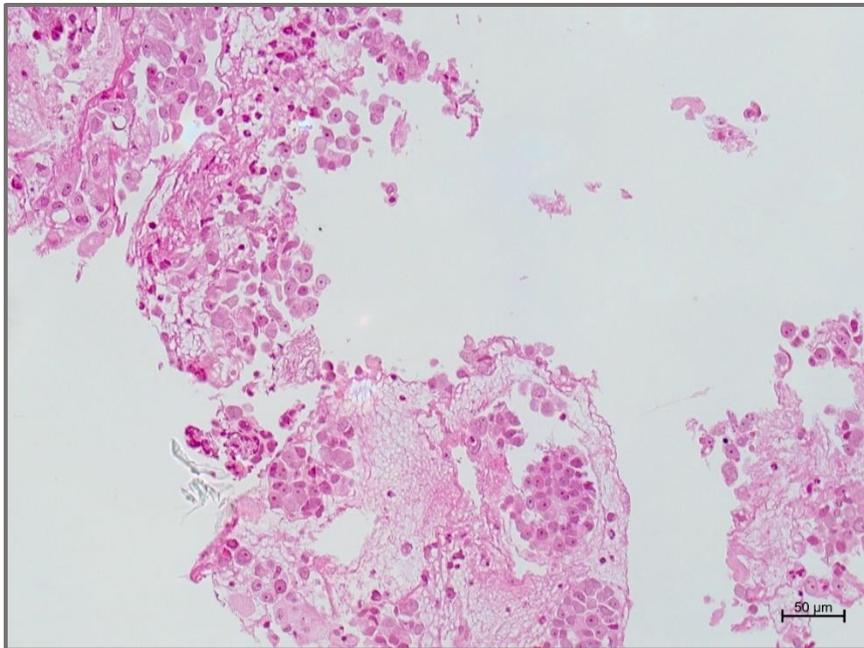


Abbildung 16: Infiltrate eines Adenokarzinoms (Histologie)
Mittelgroße atypische Epithelien, teils zu Verbänden zusammengelegen mit fokal erkennbarem drüsigem Wachstumsmuster.
Biopsie von Lungengewebe, HE-Färbung, Originalvergrößerung x20

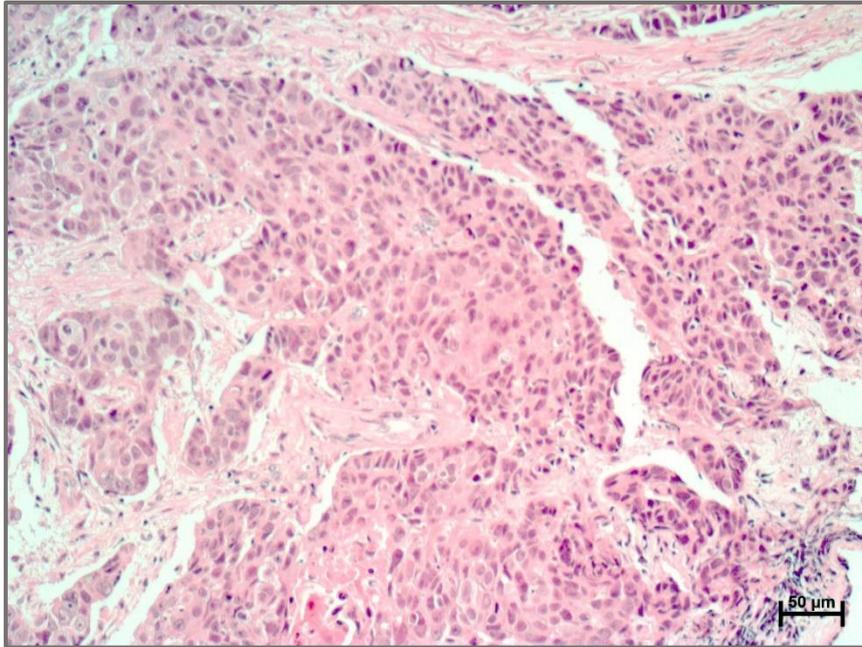


Abbildung 17: Infiltrate eines Plattenepithelkarzinoms (Biopsie)

Infiltrate eines nicht-kleinzelligen, invasiven Karzinoms mit eosinophilem Zytoplasma der Tumorzellen und fokal erkennbarer Einzelzellverhornung.

Biopsie von Lungengewebe, HE-Färbung, Originalvergrößerung x20

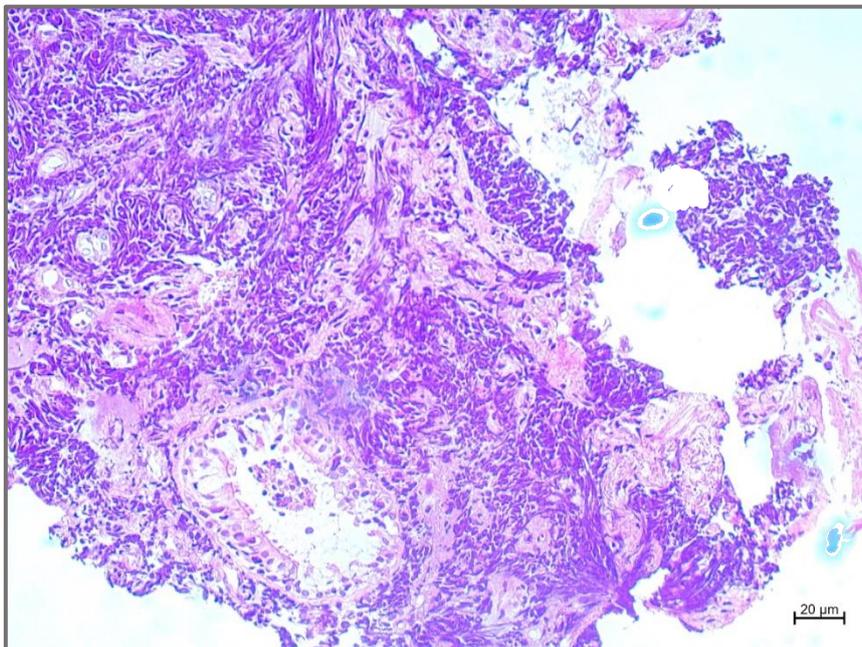


Abbildung 18: Infiltrate eines SCLC (Histologie)

Infiltrate eines kleinzelligen Tumors mit Ausbildung von Chromatinschlieren.

Biopsie von Lungengewebe, HE-Färbung, Originalvergrößerung x40.

Auffällig ist in Abbildung 19 im Vergleich zu Abbildung 13 die hohe Anzahl bei den NSCLC-NOS (n=158) und den kleinzelligen Tumoren (n=70). Beide Gruppen lassen sich häufig erst durch Immunfärbungen weiter in Subgruppen einteilen. V.a. die Unterscheidung von niedrig-differenzierten Adenokarzinomen versus unverhornten Plattenepithelkarzinomen und kleinzelligen Karzinome versus Lymphome gestaltet sich an einer HE-Färbung oft schwierig.

Weiterhin zeigt sich eine hohe Anzahl an negativen Proben, bei welchen in der Überstandszytologie oder in der Immunfärbung eine Auffälligkeit gefunden wird, weshalb sie in das Kollektiv integriert werden.

Insgesamt können durch die Betrachtung der histologischen HE-Färbungen von 564 Präparaten in n=416 Fällen (73,8%) ein maligner Tumor oder ein Carcinoma in situ diagnostiziert werden. Weitere n=15 Fälle (2,7%) sind „verdächtig“.

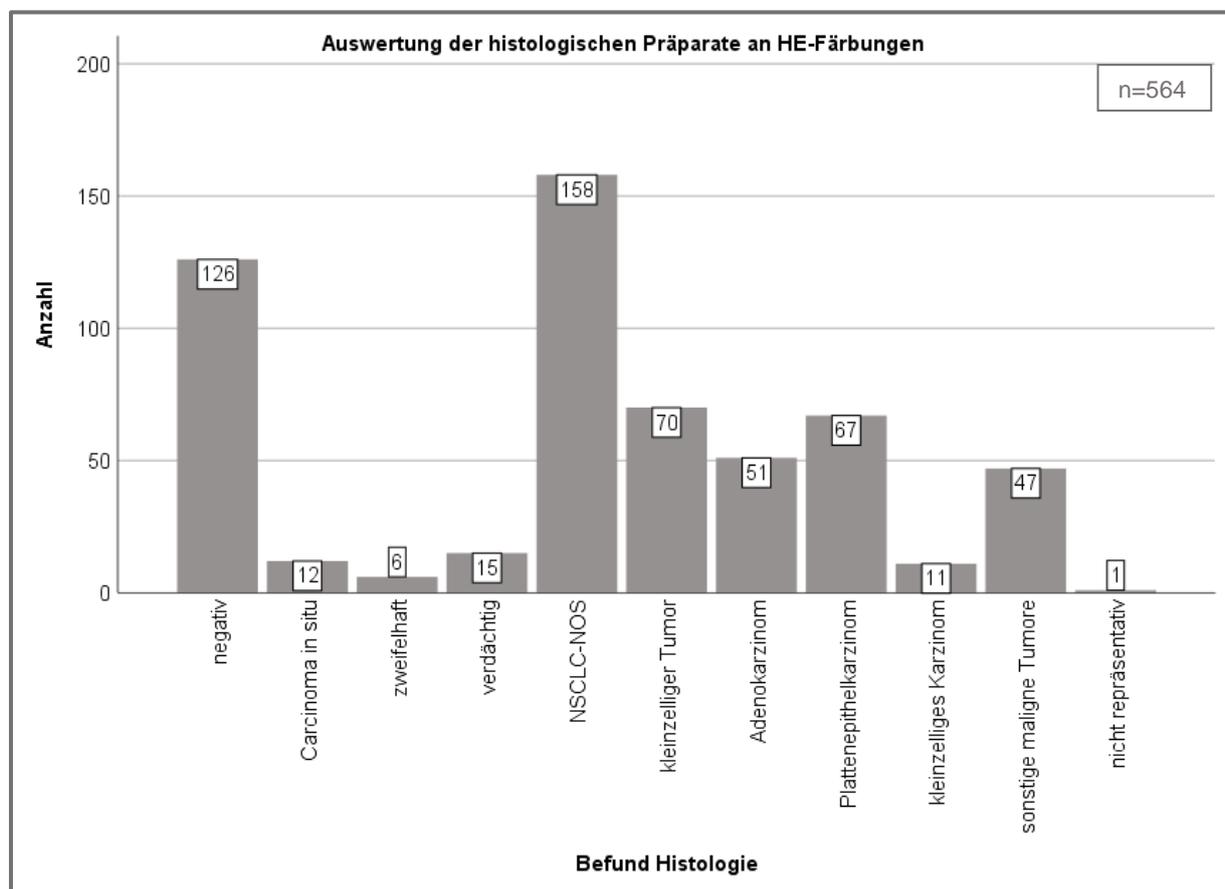


Abbildung 19: Häufigkeitsverteilung der Tumorsubtypen anhand der Auswertung der histologischen Präparate an HE-Färbungen

Das Diagramm zeigt die Diagnosen der histologischen Präparate an HE-Färbungen. Es werden insgesamt n=564 Proben betrachtet.

5.2.2 Histologie mit immunchemischen Färbungen

Fertigt man zu den Standard-HE-Präparaten zusätzlich Immunfärbungen an, können die Karzinome in histologische Subtypen unterteilt werden. Insgesamt wurden zu n=387 (68,6%) der 564 Proben in der Histologie zusätzlich Immunfärbungen angefertigt.

In Abbildung 20 zeigt sich die Summe der Ergebnisse aus den histologischen Präparaten an HE-Färbungen und den Immunfärbungen.

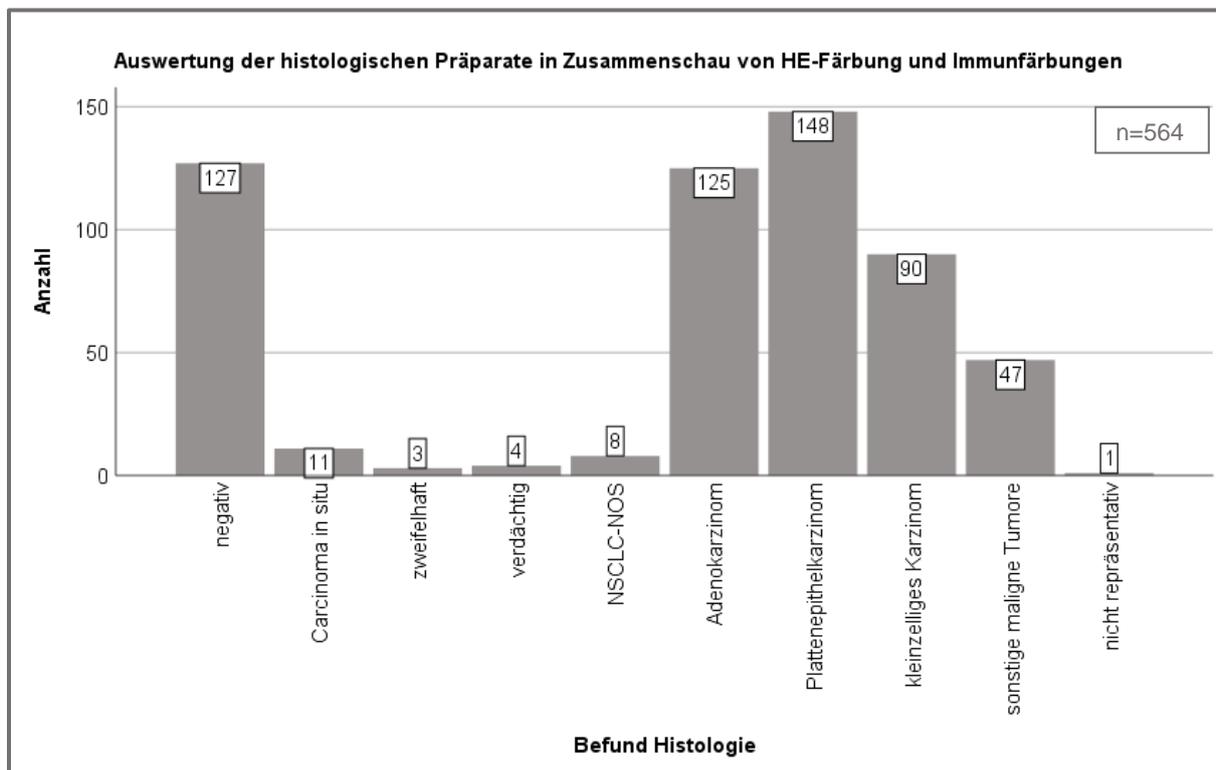


Abbildung 20: Häufigkeitsverteilung der Tumorsubtypen anhand der Zusammenschau von HE-Färbungen und Immunfärbungen

Das Diagramm zeigt die bestmöglichen Ergebnisse, die durch die HE-Färbung oder im Zusammenblick mit den Immunfärbungen gestellt werden können. Es werden insgesamt von n=564 Proben HE-Färbungen und von n=387 Immunfärbungen angefertigt.

Durch die Immunfärbungen können von den 158 mit HE-Färbungen diagnostizierten NSCLC-NOS weitere n=152 (96,2%) NSCLC den Tumorsubgruppen zugeordnet werden.

Überdies kann bei n=3 Fällen die „positive“ Tumordiagnose, die am HE-Präparat gestellt wurde, durch die Immunfärbungen nicht bestätigt werden, während bei n=5 „negativen“ histologischen Befunden an HE-Präparaten mit Immunfärbungen ein maligner Tumor diagnostiziert werden kann. Des Weiteren können n=1 in der HE-Färbung „zweifelhafter“ und n=8 „verdächtige“ histologische Befunde durch Immunfärbungen bestätigt und somit ein maligner Tumor festgestellt werden. n=3 „zweifelhafte“ und n=3 „verdächtige“ Befunde, die mit Hilfe der HE-Färbungen gestellt wurden, können durch Immunfärbungen nicht verifiziert werden, da in den weiterführenden Färbungen keine Auffälligkeiten auszumachen sind.

5.2.3 Überstandszytologie ohne immunchemische Färbungen

Zytologisch lässt sich nur sehr selten ein prädominanter Wachstumstyp bestimmen, da hier häufig nur einzelne Tumorzellen erkennbar sind und sich in den wenigsten Fällen kleine Gewebstücke finden lassen [37]. Hier wird versucht anhand der Morphologie, des Chromatins und weiteren Zellveränderungen eine weitere Typisierung zu erreichen. Das Hauptziel der Zytologie und der Überstandszytologie liegt daher vor allem in der Detektion einzelner Tumorzellen.

Deshalb werden in der Überstandzytologie an den HE-Färbungen Adenokarzinome, Plattenepithelkarzinome und kleinzellige Tumore meist ohne weitere Subtypisierung aufgeführt (Abbildung 21/22/23). Eine Ausnahme davon bildet das verhornende Plattenepithelkarzinom (n=3), da in der Überstandzytologie gelegentlich Zellen mit Verhornung sichtbar sind und so eine eindeutige Zuordnung ermöglicht wird.

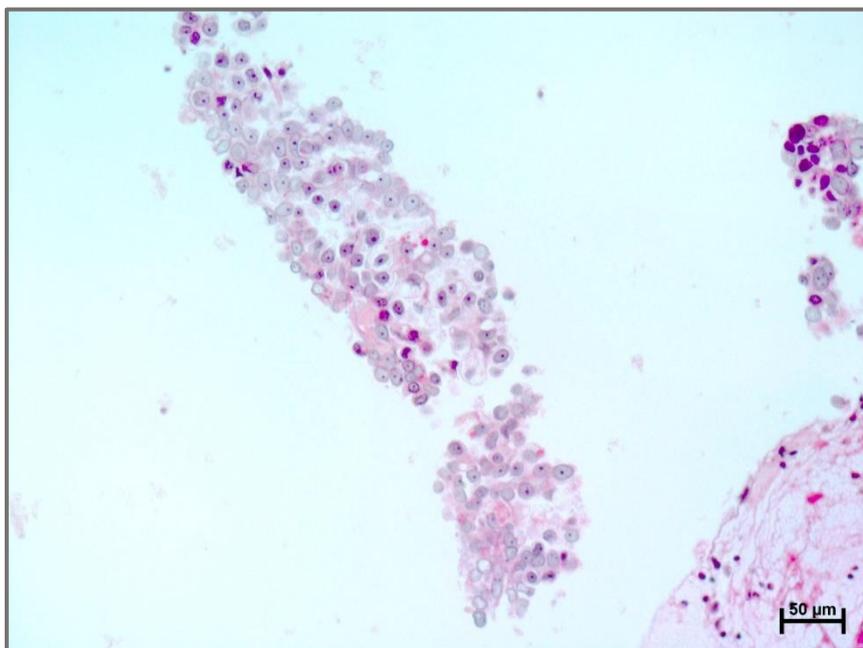


Abbildung 21: Zellen eines NSCLC, Verdacht auf Adenokarzinom (Überstandszytologie - Histogelblock)

Mittelgroße atypische, in lockerem Verband liegende Epithelien mit erkennbaren Nukleoli.

Zytologie der Lunge, HE-Färbung, Originalvergrößerung x20

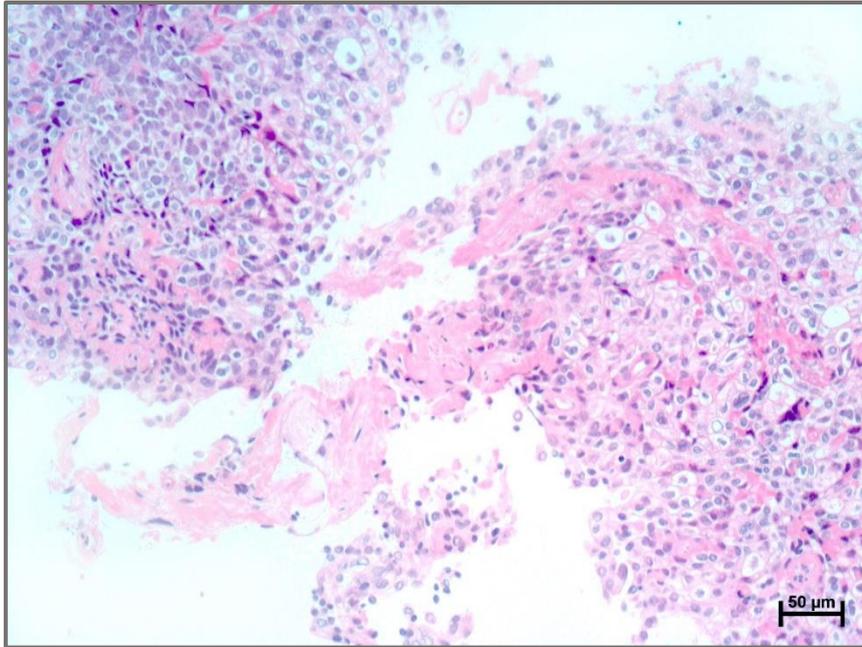


Abbildung 22: Zellen eines NSCLC, Verdacht auf Plattenepithelkarzinom (Überstandszytologie - Histogelblock)
Mittelgroße atypische Epithelverbände mit angedeutet erhaltener Schichtung und miterfasstem Tumorstroma.
Zytologie der Lunge, HE-Färbung, Originalvergrößerung x20

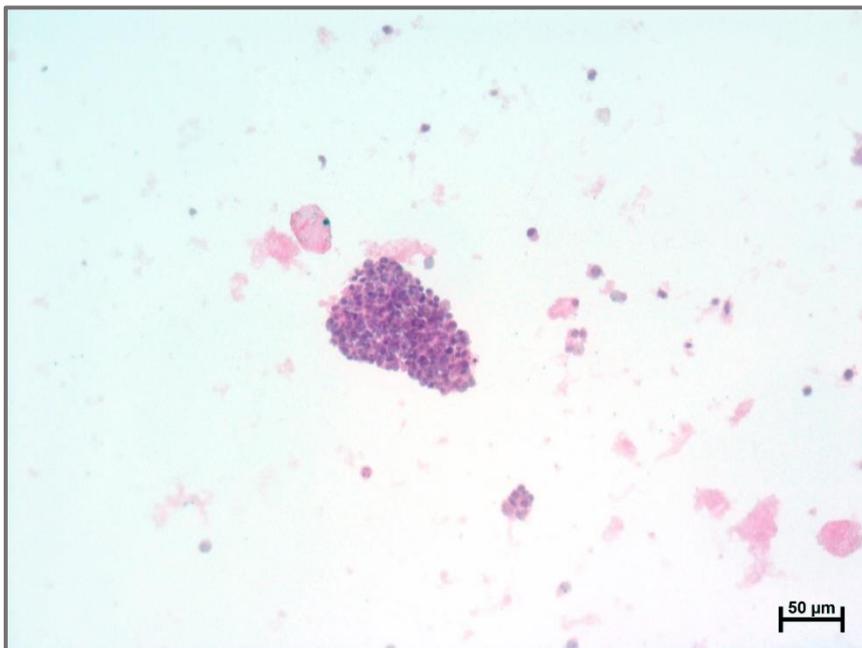


Abbildung 23: Zellen eines kleinzelligen Tumors (Überstandszytologie - Histogelblock)
Zusammengelegene, relativ kleine Zellen mit schmalem Zytoplasmaum und angedeutet hyperchromatischen Zellkernen ohne eindeutig erkennbare Nukleoli.
Zytologie der Lunge, HE-Färbung, Originalvergrößerung x20

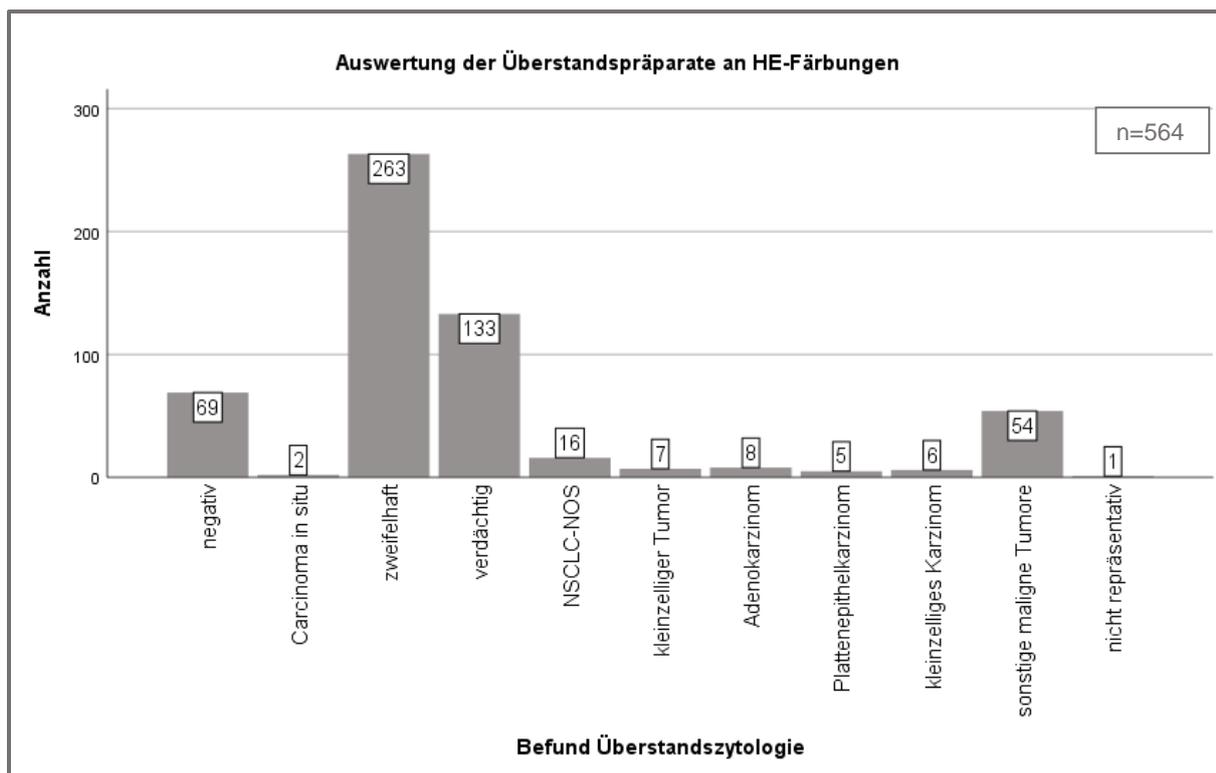


Abbildung 24: Häufigkeitsverteilung der Tumorsubtypen anhand der Auswertung der Überstandszytologie an HE-Färbungen

Das Diagramm zeigt die Diagnosen der zytologischen Präparate an HE-Färbungen. Es werden insgesamt $n=564$ Proben betrachtet.

Wie in Abbildung 24 dargestellt können so von insgesamt 564 Fällen in der Überstandzytologie $n=98$ (17,4%) Tumore inkl. Carcinoma in situ sicher diagnostiziert werden. In $n=133$ (23,6%) Fällen wurde der Befund auf „verdächtig“ festgelegt.

5.2.3.1 Unterteilung in zytologischen Histogelblock und Zytospinpräparat

Im Institut für Pathologie des UKS werden für die Fälle seit 2017 aus dem Überstand je zwei Präparate angefertigt, ein Präparat aus dem zytologischen Histogelblock (Abbildung 25) und ein Zytospinpräparat (Abbildung 26). Beide werden zusammen als ein Befund bearbeitet und angegeben. Um eine genauere Differenzierung der beiden Methoden zu ermöglichen, werden in diesem Punkt die Befunde von 172 Fällen aus den Jahren 2017 und 2018 nachmikroskopiert und als Einzelbefunde aufgetrennt. Dabei wurde für jedes Präparat eine eigene Diagnose erstellt und mit dem Befund verglichen, in dem immer das höchste Ergebnis angegeben wurde.

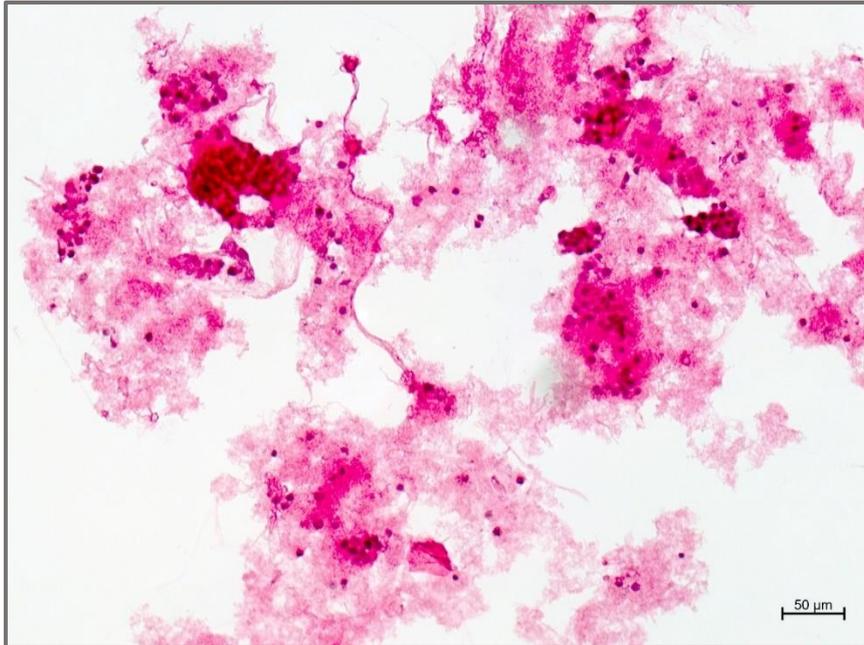


Abbildung 25: Zweifelhafter Befund (Überstandszytologie - Histogelblock)

Proteinpräzipitat mit Leukozyten und Makrophagen, ferner kleine Verbände mittelgroßer Zellen, deren Zellmembran und Zellkern nicht zweifelsfrei beurteilbar sind.

Zytologie der Lunge, HE-Färbung, Originalvergrößerung x20

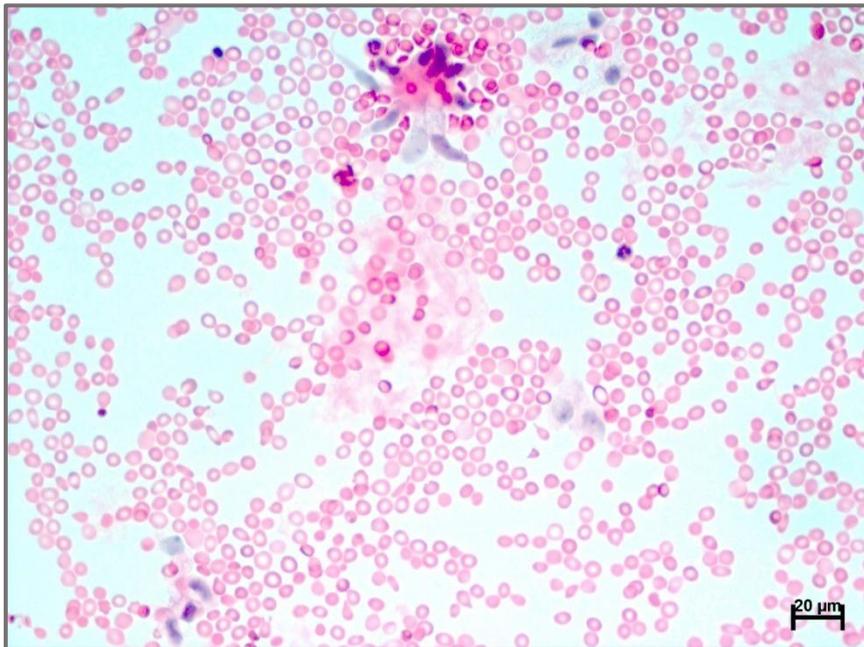


Abbildung 26: Zweifelhafter Befund (Überstandszytologie - Zytospinpräparat)

Nachweis reichlicher Erythrozyten, einzelner Leukozyten sowie ein kleiner epitheloider Zellverband mit leicht hyperchromatischen Zellkernen bei recht weitem Zytoplasmasaum.

Zytologie der Lunge, HE-Färbung, Originalvergrößerung x40

Tabelle 09 stellt dar, anhand welchen Präparats die Diagnose des Überstandsbefundes gestellt wurde und ob ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Methoden in der Diagnosestellung besteht.

		Diagnose Zytospinpräparat				Gesamt
		negativ	zweifelhaft	verdächtig	positiv	
Diagnose zyt. Histogelblock	negativ					
	abs. Anzahl (n)	24	50	6	2	82
	rel. Häufigkeit (%)	14,0%	29,1%	3,5%	1,2%	47,7%
	zweifelhaft					
	abs. Anzahl (n)	5	9	4	0	18
	rel. Häufigkeit (%)	2,9%	5,2%	2,3%	0,0%	10,5%
	verdächtig					
	abs. Anzahl (n)	2	16	6	5	29
	rel. Häufigkeit (%)	1,2%	9,3%	3,5%	2,9%	16,9%
	positiv					
	abs. Anzahl (n)	3	10	17	13	43
	rel. Häufigkeit (%)	1,7%	5,8%	9,9%	7,6%	25,0%
Gesamt						
abs. Anzahl (n)	34	85	33	20	172	
rel. Häufigkeit (%)	19,8%	49,4%	19,2%	11,6%	100,0%	
p-Wert nach McNemar					<0,001	

Tabelle 09: Vergleich der Diagnosen des Zytospinpräparats und des zytologischen Histogelblocks

In n=52 Fällen zeigen beide Methoden die gleiche Diagnose. Mit n=43 Fällen zeigt das Präparat aus dem zytologischen Histogelblock häufiger „positive Diagnosen“ an als das Zytospinpräparat mit n=20 „positiven Diagnosen“. Am häufigsten kann die Kombination einer „negativen Diagnose“ im zytologischen Histogelblock und einer „zweifelhaften Diagnose“ im Zytospinpräparat gefunden werden. Dies macht mit n=50 Fällen einen Anteil von 29,1% an allen betrachteten Fällen aus. Mit n=17 Fällen (9,9%) haben auch „positive Diagnosen“ im zytologischen Histogelblock und „verdächtige Diagnosen“ im Zytospinpräparat einen großen Anteil an den betrachteten Fällen.

Mit einem p-Wert von <0,001 wird deutlich, dass die Unterschiede in den Ergebnissen nicht zufällig die vorliegende Verteilung zeigen.

5.2.4 Überstandszytologie mit immunchemischen Färbungen

Im Vergleich mit der Histologie (Abbildung 20) ist in Abbildung 27 nur eine geringe Änderung sichtbar. Dies liegt darin begründet, dass von den 564 Überstandspräparaten nur in n=11 (2%) Fällen immunhistochemische Färbungen angefertigt wurden. Von diesen 11 Fällen kann in n=1 Fall ein kleinzelliges Karzinom und n=1 Adenokarzinom bewiesen werden. In n=5 Fällen kann ein maligner Tumor nicht bestätigt werden. In n=4 Fällen ist die Diagnose der Immunfärbungen gleich der Diagnose der HE-Färbung.

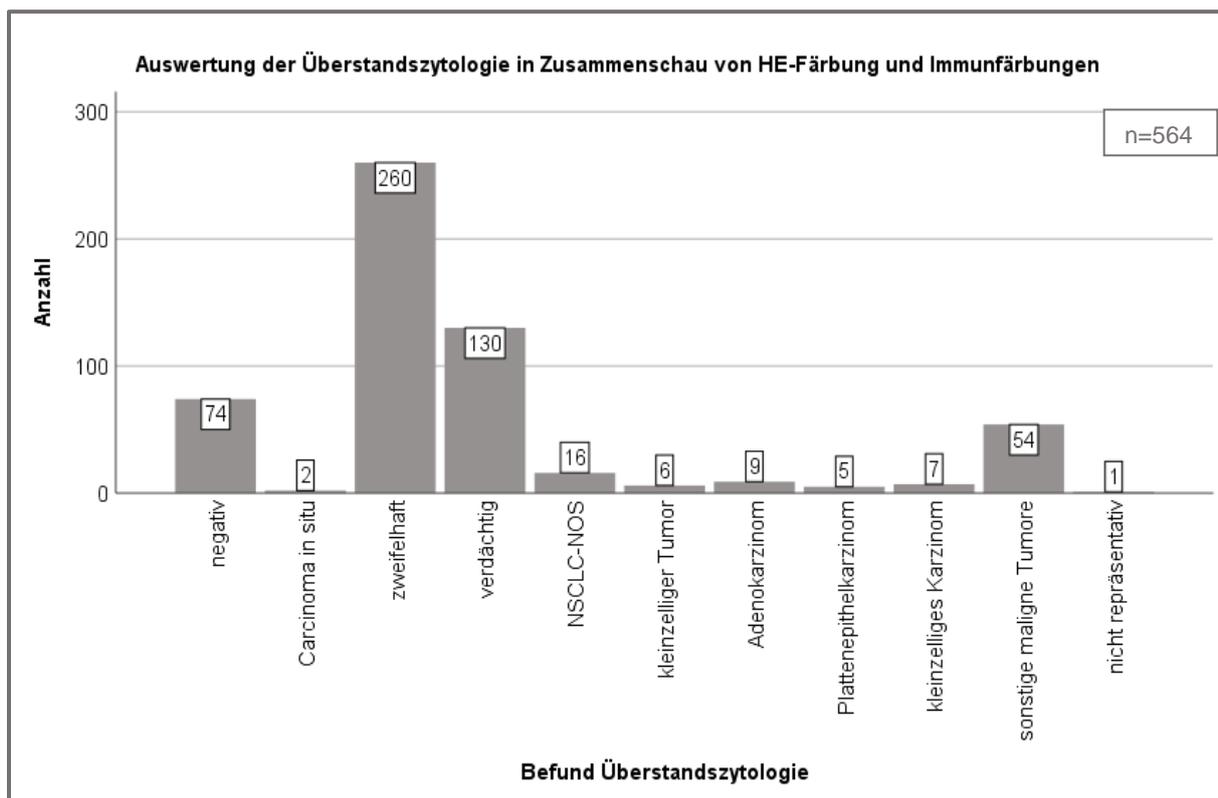


Abbildung 27: Häufigkeitsverteilung der Tumorsubtypen anhand der Auswertung der Überstandszytologie unter Zuhilfenahme von Immunfärbungen

Das Diagramm zeigt die bestmöglichen Ergebnisse, die durch die HE-Färbung oder im Zusammenblick mit den Immunfärbungen gestellt werden können. Es wurden insgesamt von n=564 Proben HE-Färbungen und von n=11 Immunfärbungen angefertigt.

Die kleine Anzahl der Immunfärbungen bei der Überstandszytologie liegt darin begründet, dass in der Regel zunächst an den histologischen Schnitten eine Immunfärbung durchgeführt wird. Kann dadurch eine Diagnose gestellt bzw. gesichert werden, werden zur Materialschonung an den Überstandspräparaten keine weiterführenden Färbungen durchgeführt.

5.2.5 Auffällige Überstandszytologie

Von den gesamten 564 betrachteten Fällen ist in der Überstandszytologie mit $n=263$ (46,6%) Fällen und nur $n=6$ (1,1%) Fällen bei der Histologie die Kategorie „zweifelhaft“ bemerkenswert. Auch die „verdächtigen“ Fälle mit einer Anzahl von $n=133$ (23,6%) sind in der Überstandszytologie deutlich höher als in der Histologie mit $n=15$ (2,7%) Fällen.

Es stellt sich daher die Frage, ob diese Fälle, die eine Auffälligkeit aufweisen, wirklich einen malignen Tumor anzeigen oder ob sie z. B. wegen verfälschenden Artefakten als auffällig eingestuft wurden.

Die Gruppen „zweifelhaft“ und „verdächtig“ werden für folgende Auswertungen als eine Gruppe mit dem Titel „auffällig“ zusammengefasst. Somit gibt es insgesamt $n=396$ (70,2%) auffällige Überstandspräparate in HE-Färbungen.

Tabelle 10 gibt einen Überblick, ob die auffälligen Überstandsbefunde zu Recht auffällig sind und auf einen malignen Tumor hinweisen.

Auffällige Überstandszytologie, ...	abs. Anzahl (n)	rel. Häufigkeit (%)
... widerlegt durch Immunf./negative Histologie/in anderen Einsendungen kein Tumor	57	14,4%
... belegt durch Histologie/Immunf.	260	65,7%
... Histologie verdächtig/zweifelhaft/negativ; Tumor in gleicher Lokalisation innerhalb von +/- 1 Jahr	48	12,1%
... Histologie verdächtig/zweifelhaft/negativ; Tumor in anderer Lokalisation innerhalb von +/- 1 Jahr	31	7,8%
Gesamt auffällige Überstandszytologie	396	100,0%

Tabelle 10: Überblick über die auffälligen Überstandszytologien

In Tabelle 10 zeigt sich, dass $n=57$ (14,4%) der 396 „auffälligen“ Überstandsbefunde entweder direkt durch Immunfärbungen widerlegt werden können oder auch in anderen Einsendungen kein maligner Tumor gefunden werden kann.

In $n=260$ Fällen (65,7%) können die Auffälligkeiten in der Überstandszytologie durch eine positive Histologie oder Immunfärbungen bestätigt werden. In weiteren $n=48$ Fällen (12,1%) finden sich bei „negativer“ oder maximal „zweifelhafter/verdächtiger“ Histologie in anderen Proben aus der gleichen Lokalisationsgruppe ein positiver Tumorbefund.

Bei $n=31$ Fällen (7,8%) kann in einer anderen Lokalisationsgruppe ein Tumor gefunden werden. Inwieweit diese Überstandspräparate richtig oder falsch positiv sind, lässt sich mit den vorliegenden Daten nicht beurteilen.

Tabelle 11 stellt die auffälligen Überstandsbefunde aus Tabelle 10 im Vergleich zu den histologischen Befunden und anderen eingesandten Proben in vollständiger Ausführung dar und zeigt somit, wie sich die Befundkombinationen im Detail verhalten.

Überstandszyt.	Überstandszyt. + Immunf.	Histologie	Histologie + Immunf.	maligner Tumor in anderen Präparaten	abs. Anzahl (n)
auffällig	positiv	negativ	negativ	- ²	1
auffällig	positiv	auffällig	positiv	- ²	1
auffällig	- ¹	positiv	(falls angefertigt) positiv	- ²	258
auffällig	- ¹	positiv	negativ	gleiche Lokalisation	3
auffällig	- ¹	auffällig	auffällig	gleiche Lokalisation	2
auffällig	auffällig	auffällig	negativ	gleiche Lokalisation	1
auffällig	- ¹	auffällig	- ¹	gleiche Lokalisation	1
auffällig	- ¹	auffällig	negativ	gleiche Lokalisation	2
auffällig	auffällig	negativ	negativ	gleiche Lokalisation	1
auffällig	- ¹	negativ	- ¹	gleiche Lokalisation	38
Gesamtzahl der auffälligen Überstandszytologien mit definitiv diagnostiziertem malignem Tumor in der entsprechenden Immunf., in den entsprechenden histologischen Präparaten oder in anderen Einsendungen der gleichen Stelle					308
auffällig	- ¹	auffällig	auffällig	andere Lokalisation	1
auffällig	- ¹	negativ	- ¹	andere Lokalisation	30
Gesamtzahl der auffälligen Überstandszytologie mit definitiv diagnostiziertem malignem Tumor an anderer Stelle					31
auffällig	- ¹	auffällig	auffällig	nirgends	1
auffällig	auffällig	negativ	- ¹	nirgends	1
auffällig	- ¹	auffällig	negativ	nirgends	1
auffällig	- ¹	negativ	- ¹	nirgends	49
auffällig	negativ	positiv	positiv	- ²	2
auffällig	negativ	auffällig	negativ	- ²	1
auffällig	negativ	positiv	auffällig	- ²	1
auffällig	negativ	negativ	- ¹	- ²	1
Gesamtzahl der auffälligen Überstandszytologie, bei denen kein maligner Tumor gefunden werden kann, bzw. durch Immunf. direkt widerlegt wird					57

Tabelle 11: Auffällige Überstandszytologien

„Positiv“=in entsprechendem Präparat ließ sich ein maligner Tumor oder Carcinoma in situ nachweisen; „auffällig“=Präparat wird als zweifelhaft oder verdächtig eingestuft; „negativ“=es

kann definitiv kein maligner Tumor nachgewiesen werden; „Tumor an gleicher Lokalisation“= maligner Tumor in gleicher Lokalisationsgruppe innerhalb von +/- 1 Jahr; „maligner Tumor an anderer Lokalisation“= maligner Tumor in anderer Lokalisationsgruppe innerhalb von +/- 1 Jahr; „nirgends ein maligner Tumor gefunden“=in keinem anderen Auftrag innerhalb von +/- 1 Jahr kann ein maligner Tumor gefunden werden

¹ wurde nicht angefertigt; ² wurde nicht betrachtet, da Ergebnis der Überstandszytologie bereits durch Immunf./Histologie widerlegt, bzw. bestätigt wurde

In n=2 (0,5%) der insgesamt 396 auffälligen Fälle wird die Überstandszytologie direkt durch Immunfärbungen bestätigt und in n=258 (62,2%) Fällen werden in den korrespondierenden histologischen Präparaten und deren Immunfärbungen maligne Tumore oder ein Carcinoma in situ gefunden.

In n=9 (2,3%) Fällen zeigt die entsprechende Histologie ebenfalls Auffälligkeiten, die in n=4 (1,0%) Fällen durch Immunfärbungen an der Histologie widerlegt werden. In n=3 (0,8%) anderen Fällen widerlegen die Immunfärbungen einen positiven histologischen Befund.

In n=38 (9,6%) Fällen zeigt die Überstandszytologie und in n=1 (0,3%) weiteren Fall auch deren Immunfärbung auffällige Befunde, während in der Histologie der Befund negativ ausfällt. Auch hier wird in einer anderen Probe der gleichen Lokalisation ein Tumor diagnostiziert.

Bei insgesamt n=31 (7,8%) Fällen, in denen die Überstandspräparate ebenfalls als auffällig bewertet werden, kann in einem anderen Auftrag in einer anderen Lokalisation der Lunge ein maligner Tumor diagnostiziert werden.

In n=57 (14,4%) Fällen kann weder in der Histologie, den entsprechenden Immunfärbungen, noch in anderen eingesandten Proben ein maligner Tumor gefunden werden.

Somit können insgesamt 77,8% (n=308) der auffälligen Überstandsbefunde, bestätigt durch Histologie, Immunfärbungen oder andere Einsendung der gleichen Lokalisationsgruppe, auf einen malignen Tumor hinweisen, bei 14,4% (n=57) kann auch in anderen Einsendungen kein maligner Tumor gefunden werden. Während in 7,8% (n=31) der Fälle in einer anderen Einsendung ein maligner Tumor gefunden wurde, der sich aber in einer anderen Lokalisationsgruppe befindet.

5.2.6 Vergleich zwischen Histologie und Überstandszytologie an HE-Färbungen

5.2.6.1 Tumorsubtypen

Tumorsubtypen	Histologie an HE-Färbungen		Überstandszyt. an HE-Färbungen	
	abs. Anzahl (n)	rel. Häufigkeit (%)	abs. Anzahl (n)	rel. Häufigkeit (%)
negativ	126	22,3%	69	12,2%
Carcinoma in situ	12	2,1%	2	0,4%
zweifelhaft	6	1,1%	263	46,6%
verdächtig	15	2,7%	133	23,6%
NSCLC-NOS	158	28,0%	16	2,8%
kleinzelliger Tumor	70	12,4%	7	1,2%
kleinzelliges Karzinom	11	2,0%	6	1,1%
Adenokarzinome	-	-	8	1,4%
lepidisch	4	0,7%	-	-
azinär	25	4,4%	-	-
mikropapillär	6	1,1%	-	-
kribriform	1	0,2%	-	-
solide	15	2,7%	-	-
Plattenepithelkarzinome	-	-	3	0,5%
verhornt	45	8,0%	2	0,4%
unverhornt	22	3,9%	-	-
Metastasen	5	0,9%	3	0,5%
sonstige maligne Tumore	42	7,4%	51	9,0%
nicht repräsentativ	1	0,2%	1	0,2%
Gesamt positive Diagnosen	404	71,6%	96	17,0%
Gesamt positive Diagnosen inkl. Carcinoma in situ	416	73,8%	98	17,4%
Gesamt	564	100%	564	100%

Tabelle 12: Vergleich von Histologie und Überstandszytologie an HE-Färbungen

Stellt man die Histologie und die Überstandszytologie an HE-Färbungen in direktem Vergleich zueinander (Tabelle 12), erkennt man, dass anhand der Histologie 73,8% (n= 416) und anhand der Überstandszytologie 17,4% (n=98) maligne Tumore inkl. Carcinoma in situ diagnostiziert werden können.

5.2.6.2 Wertigkeit der Verfahren in Bezug auf die Tumorerkennung

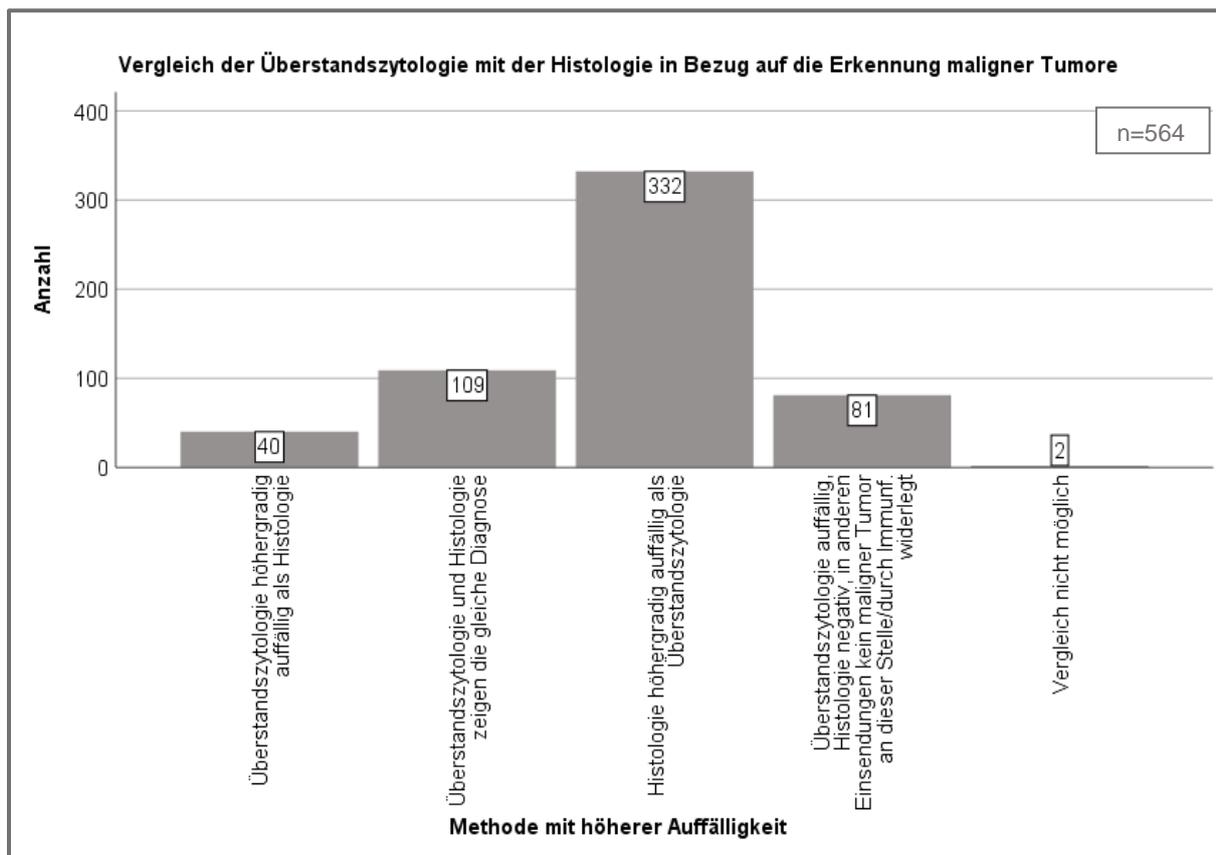


Abbildung 28: Vergleich der Überstandszytologie mit der Histologie in Bezug auf die Erkennung maligner Tumore

„höhergradig“ wird hier definiert als, dass die jeweilige Methode positiv war oder eine höhere Auffälligkeit gezeigt hat. War der Befund „zweifelhaft“ oder „verdächtig“ und wurde der Tumordverdacht entweder durch eine Immunfärbung bestätigt oder es wurde im Zeitraum +/- 1 Jahr von der Probeentnahme an der gleichen Stelle ein maligner Tumor gefunden, wird dies auch als „höhergradig“ gewertet.

Ist die Überstandszytologie auffällig, die Histologie negativ und es kann an keiner anderen Stelle ein maligner Tumor gefunden werden, bzw. die Auffälligkeit wird durch eine Immunfärbung direkt widerlegt, kann sie nicht als besser gewertet werden.

„Vergleich nicht möglich“ tritt auf, wenn eine Methode nicht repräsentativ ist.

Betrachtet man nun die Fälle zwischen Histologie und Überstandszytologie an HE-Färbungen im Blick auf die Frage, welche Methode eine höhergradige Auffälligkeit vorweist, so zeigen sich deutliche Unterschiede. Bei den Fällen, bei denen die Überstandsdiagnostik auffällig war und in der Histologie kein Hinweis auf einen malignen Tumor gefunden werden konnte, wurde geprüft, ob in einer anderen Einsendung an dieser Stelle innerhalb von 1 Jahr vor oder nach der Probeentnahme ein maligner Tumor gefunden werden konnte. Trifft dies zu, werden die auffälligen Überstandszytologien als höhergradig auffällig gewertet. Kann auch in anderen Einsendungen an dieser Stelle kein maligner Tumor gefunden werden oder war die entsprechende Immunfärbung der Überstandszytologie negativ, fallen diese Fälle in die vierte der fünf Kategorien aus Abbildung 28.

Abbildung 28 zeigt, dass in n=332 (58,9%) Fällen die Methode der Histologie höhergradigere Auffälligkeiten gezeigt hat als die Überstandszytologie. In n=40 (7,1%) Fällen ist jedoch die Überstandszytologie in höherem Maße auffälliger (oder positiv) als die Histologie.

In n=81 (14,4%) Fällen ist die Überstandszytologie auffällig, der Verdacht auf einen malignen Tumor kann aber in keiner anderen Einsendung oder der Histologie bestätigt werden.

5.2.6.3 Diagnostische Wahrscheinlichkeiten der beiden Verfahren

Um zwei Verfahren objektiv vergleichen zu können, werden statistische Maßzahlen herangezogen.

Folgende Tabellen zeigen die den Maßzahlen zugrunde liegenden Vierfeldertafeln für die Ergebnisse der Histologie (Tabelle 13) und der Überstandszytologie (Tabelle 14).

Dabei wird das Ergebnis der Histologie, bzw. der Überstandszytologie an HE-Färbungen gegen die Zusammenschau aus Überstandszytologie, Histologie, Immunfärbungen und evtl. positiven Diagnosen an gleicher Lokalisation aus anderen Einsendungen aufgetragen. Die Zusammenschau aus allen Methoden und weiteren Ergebnissen aus anderen Einsendungen, das „Referenzergebnis“, wird als die korrekte Diagnose angesehen und dient als Goldstandard für die Berechnung der folgenden statistischen Kennzahlen. Das Referenzergebnis wird auch in den folgenden Punkten verwendet.

Kann bei nicht eindeutigen positiven Diagnosen in anderen Einsendungen kein maligner Tumor an der gleichen Stelle gefunden werden, wird das Referenzergebnis auf „negativ“ festgelegt. Wird in anderen Einsendungen jedoch ein maligner Tumor an der gleichen Lokalisation gefunden, wird das Referenzergebnis als „positiv“ bestimmt.

Da bereits ein verdächtiges Ergebnis zu einer weiteren Abklärung führt, wurden „verdächtige“ und „positive“ Diagnosen zusammengefasst. Ein „zweifelhafter“ oder „negativer“ Befund hat für die weitere Diagnostik weniger starke Folgen, weshalb auch diese zu einer Gruppe zusammengefasst werden.

	Referenz- ergebnis positiv	Referenz- ergebnis negativ	Gesamt
Histologie verdächtig/positiv	428	3	431
Histologie negativ/zweifelhaft	49	83	132
Gesamt	477	86	563 ¹

Tabelle 13: Vierfeldertafel der Histologie

¹ 1 Fall nicht repräsentativ, wird nicht gewertet

	Referenzergebnis positiv	Referenzergebnis negativ	Gesamt
Überstandszytologie verdächtig/positiv	228	3	231
Überstandszytologie negativ/zweifelhaft	249	83	332
Gesamt	477	86	563 ¹

Tabelle 14: Vierfeldertafel der Überstandszytologie

¹ Fall nicht repräsentativ, wird nicht gewertet

Basierend auf den oben gezeigten Tabellen wird für beide Verfahren die Sensitivität, die Spezifität, der positive prädiktive Wert (PPW) und der negative prädiktive Wert (NPW) berechnet:

$$\text{Sensitivität}_{\text{Histologie}} = \frac{\text{richtig positive histologische Testergebnisse}}{\text{alle Erkrankten laut Referenzergebnis}} = \frac{428}{477} \approx 0,90$$

$$\text{Spezifität}_{\text{Histologie}} = \frac{\text{richtig negative histologische Testergebnisse}}{\text{alle Gesunden laut Referenzergebnis}} = \frac{83}{86} \approx 0,97$$

$$\text{PPW}_{\text{Histologie}} = \frac{\text{richtig positive histologische Testergebnisse}}{\text{alle positiven histologischen Testergebnisse}} = \frac{428}{431} \approx 0,99$$

$$\text{NPW}_{\text{Histologie}} = \frac{\text{richtig negative histologische Testergebnisse}}{\text{alle negative histologische Testergebnisse}} = \frac{83}{132} \approx 0,63$$

$$\text{Sensitivität}_{\text{Überstandszytologie}} = \frac{\text{richtig positive überstandszytologische Testergebnisse}}{\text{alle Erkrankten laut Referenzergebnis}} = \frac{228}{477} \approx 0,48$$

$$\text{Spezifität}_{\text{Überstandszytologie}} = \frac{\text{richtig negative überstandszytologische Testergebnisse}}{\text{alle Gesunden laut Referenzergebnis}} = \frac{83}{86} \approx 0,97$$

$$\text{PPW}_{\text{Überstandszytologie}} = \frac{\text{richtig positive überstandszytologische Testergebnisse}}{\text{alle positiven überstandszytologische Testergebnisse}} = \frac{228}{231} \approx 0,99$$

$$\text{NPW}_{\text{Überstandszytologie}} = \frac{\text{richtig negative überstandszytologische Testergebnisse}}{\text{alle negative überstandszytologische Testergebnisse}} = \frac{83}{332} \approx 0,25$$

In dieser Arbeit wurden nur Präparate (n=564) verwendet, die entweder in der Überstandszytologie oder der Histologie ein pathologisches Ergebnis, also „zweifelhaft“, „verdächtig“ oder „positiv“, gezeigt haben. Fälle, in denen die Diagnose in beiden Methoden „negativ“ war, wurden nicht betrachtet. Somit können die Sensitivität, die Spezifität und der NPW nicht zum korrekten Vergleich mit anderen Arbeiten herangezogen werden, da Fälle, in denen beide Methoden richtig oder falsch negativ waren, nicht betrachtet wurden.

Um eine Tendenz zu erhalten, wurden sie in dieser Arbeit trotzdem mitberechnet. In diesen Zahlen lässt sich für die Histologie eine Tendenz der Sensitivität von 0,90, der Spezifität von 0,97 und des NPW von 0,63 erkennen. Die Überstandszytologie zeigt eine Tendenz für die Sensitivität von 0,48 und für den NPW von 0,25. In der Spezifität und dem PPW tendiert die Überstandszytologie mit einem Wert von 0,97, bzw. 0,99 zu höheren Werten als in der Sensitivität und dem NPW. Der PPW ist bei den verwendeten Fällen aussagekräftig und kann zum Vergleich herangezogen werden. Er liegt bei beiden Methoden bei 0,99.

5.3 Fallbeispiele

5.3.1 Diagnosestellung anhand der Überstandszytologie bei negativer Histologie

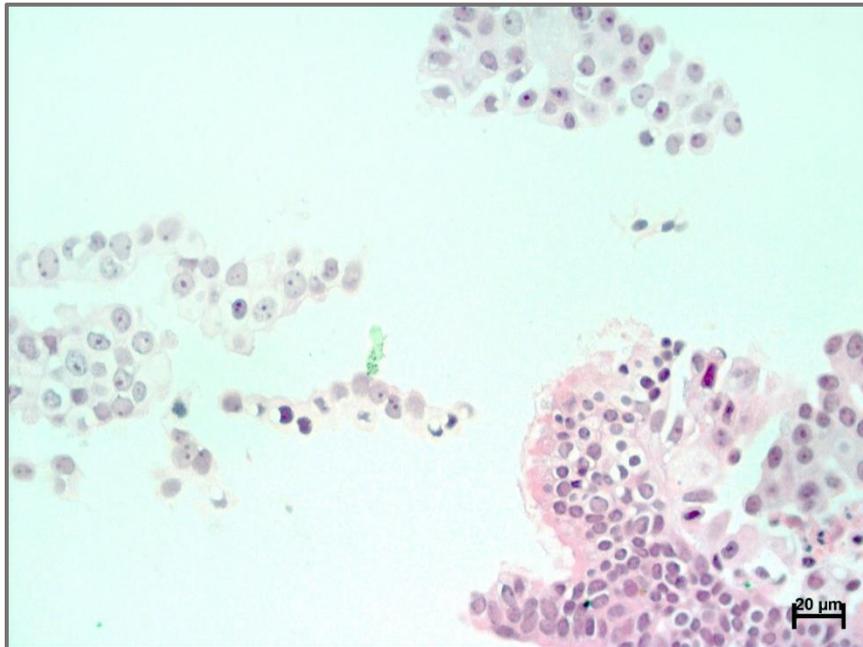


Abbildung 29: Verdächtiger Befund (Überstandszytologie - Histogelblock)

In der rechten Bildhälfte Nachweis von respiratorischem Epithel mit erhaltenem Flimmerhaarbesatz; in der linken Bildhälfte und oben lockere Zellverbände mittelgroßer epitheloider Zellen mit endrundeten Zellkernen und deutlichen Nukleolen; verdächtig auf Zellmaterial eines NSCLC.

Zytologie der Lunge, HE-Färbung, Originalvergrößerung x40

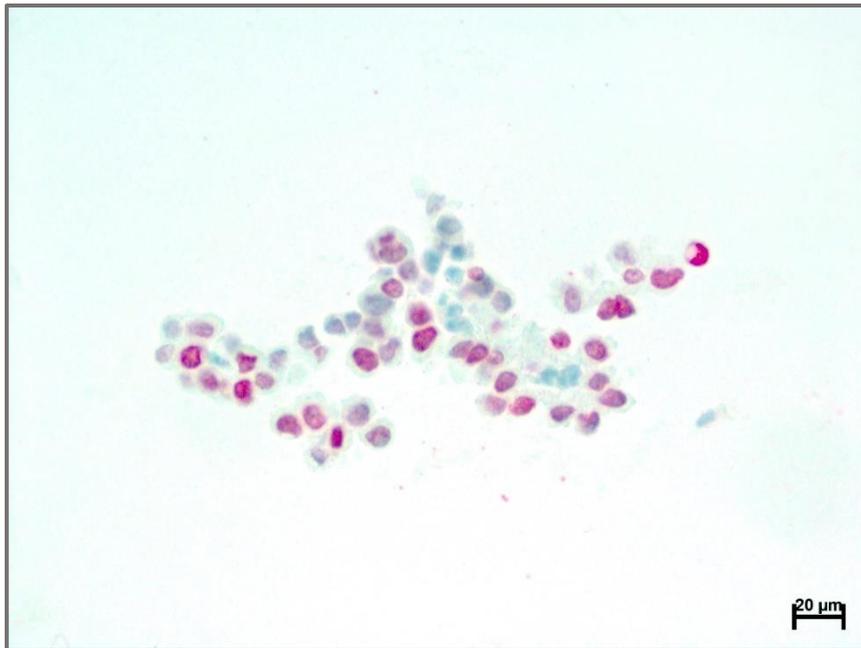


Abbildung 30: Zellen eines TTF-1-positiven Adenokarzinoms (Überstandszytologie – Histogelblock)

Nachweis mittelgroßer, in lockeren Verbänden gelegenen Zellen mit Anisonukleosomen und spezifischer nukleärer Immunreaktivität für TTF-1.

Zytologie der Lunge, Immunf. gegen TTF-1, Originalvergrößerung x40

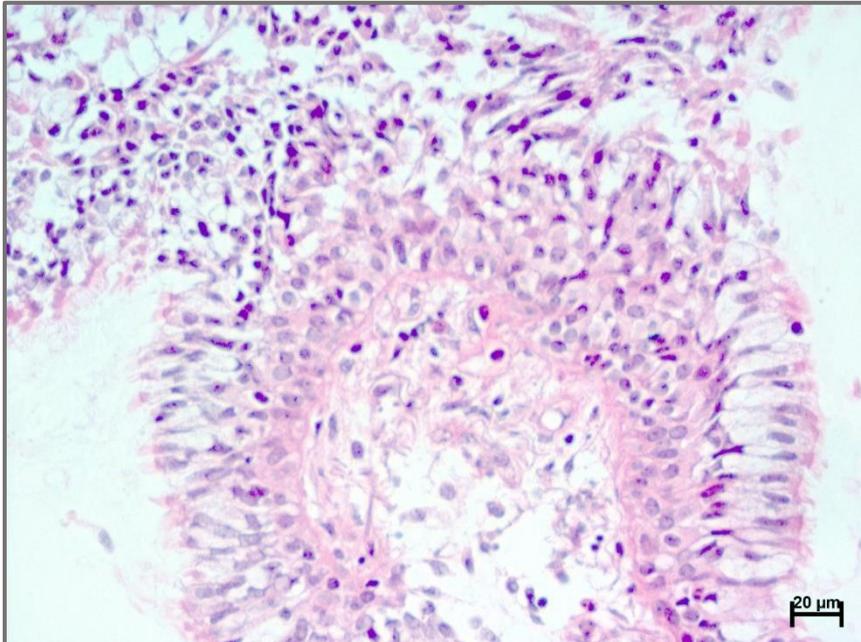


Abbildung 31: Negativer Befund (Histologie)

Respiratorisches Epithel mit vermehrten Becherzellen und subepithelial eingestreuten Lymphozyten ohne Nachweis atypieverdächtiger Zellverbände, vereinbar mit einer chronischen Bronchitis.

Biopsie der Lunge, HE-Färbung, Originalvergrößerung x40

In diesem Fall handelt es sich um eine transbronchiale Biopsie aus dem RB3-Bronchus. Von klinischer Seite wurde auf dem Einsendeschein vermerkt, dass ein Verdacht auf ein Lungenkarzinom im rechten Oberlappen vorliegt.

In der Überstandszytologie zeigt sich ein „malignitätsverdächtiger Befund“ (Abbildung 29) mit atypischen Zellverbänden aus mittelgroßen Zellen mit schlecht abgrenzbaren Zellgrenzen und pleomorphen, hyperchromatischen bis aufgehellten Zellkernen, die zum Teil Nukleolen enthalten. Das Zytoplasma liegt als ein mäßig breiter Saum vor. Außerdem sind respiratorische Epithelien, Plattenepithelzellen und Blutzellen zu erkennen.

Der Verdacht auf einen malignen Tumor kann durch eine Färbung gegen TTF-1 bewiesen werden (Abbildung 30). Bei gleichzeitiger Negativität der Tumorzellen gegen p40 (hier nicht bildlich dargestellt) kann ein Plattenepithelkarzinom ausgeschlossen werden. Dadurch wird belegt, dass es sich um ein Adenokarzinom handelt.

In der entsprechenden Histologie und deren Immunfärbungen zeigt sich das Bild einer chronischen Bronchitis ohne Hinweise auf einen malignen Tumor, weshalb sie als „negativ“ beschrieben wird (Abbildung 31).

Die Tumordiagnose Adenokarzinom wird in diesem Fall ausschließlich anhand der Überstandszytologie und deren Immunfärbung gestellt.

5.3.2 Diagnosestellung in Zusammenschau von Überstandszytologie und Histologie

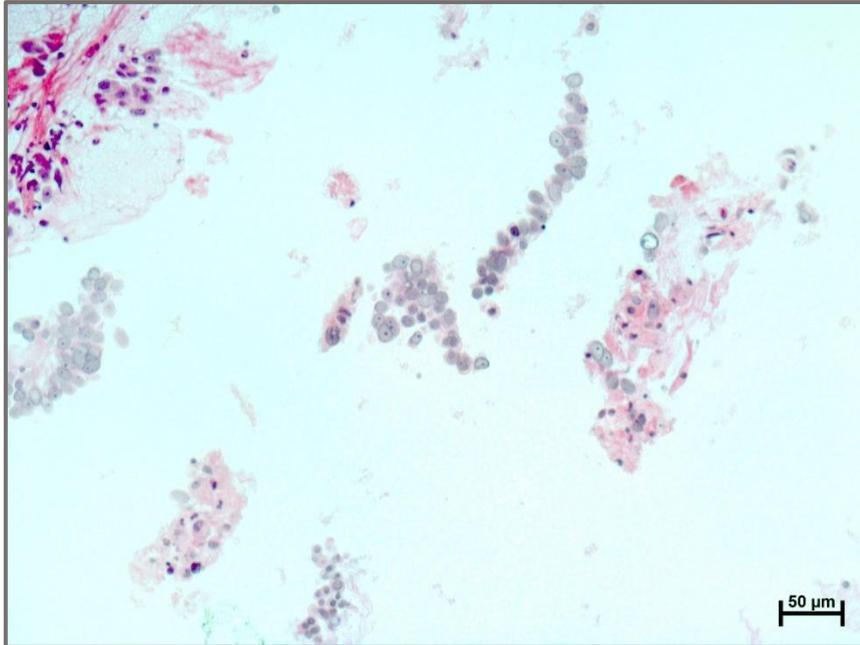


Abbildung 32: Zellen eines NSCLC, Verdacht auf Adenokarzinom (Überstandszytologie - Histogelblock)

Oben links erkennbare Leukozyten und einzelne Zylinderepithelien, in der Bildmitte zu kleinen Verbänden zusammengelegene atypische epitheliale mittelgroße Zellen.

Zytologie der Lunge, HE-Färbung, Originalvergrößerung x20

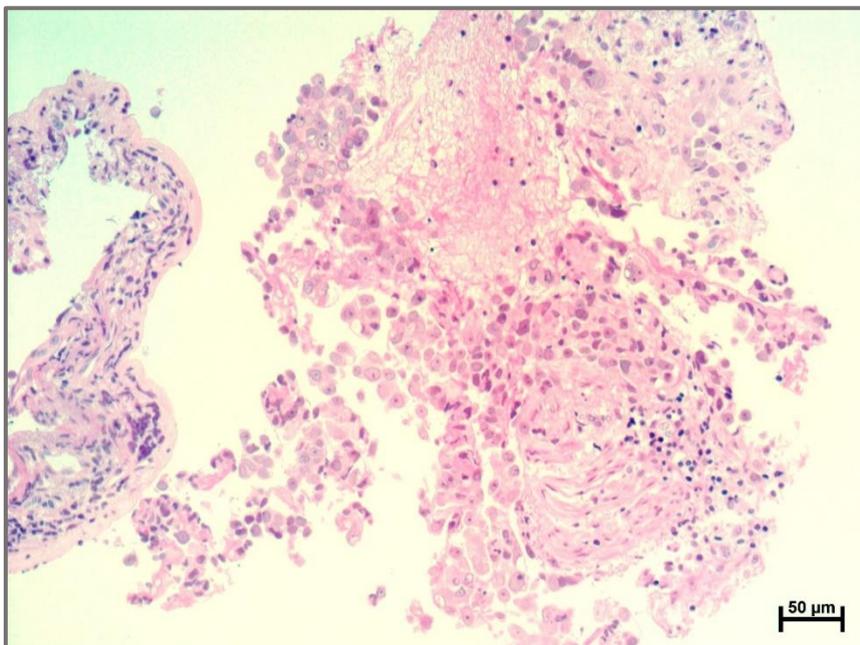


Abbildung 33: Infiltrate eines Adenokarzinoms (Histologie)

Verbände mittelgroßer Zellen mit Anisonukleosen, fokal unter Ausbildung von Mikropapillen; chronische Begleitentzündung.

Biopsie von Lungengewebe, HE-Färbung, Originalvergrößerung x20

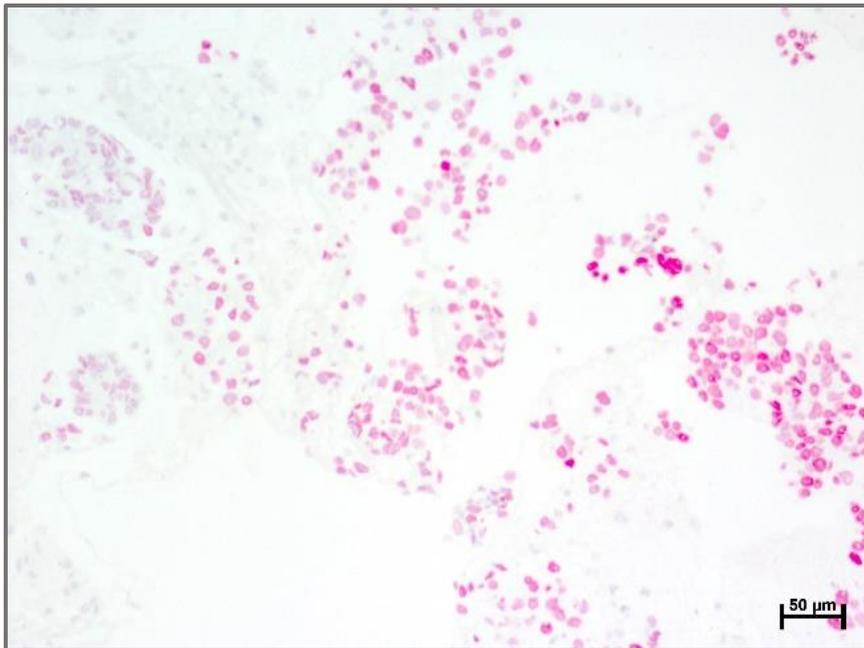


Abbildung 34: TTF-1-positive Infiltrate eines Adenokarzinoms (Histologie)

Verbände mittelgroßer atypischer Zellen mit Anisonukleosen und spezifischer nukleärer Immunreaktivität gegen TTF-1.
Biopsie von Lungengewebe, Immunf. gegen TTF-1, Originalvergrößerung x20

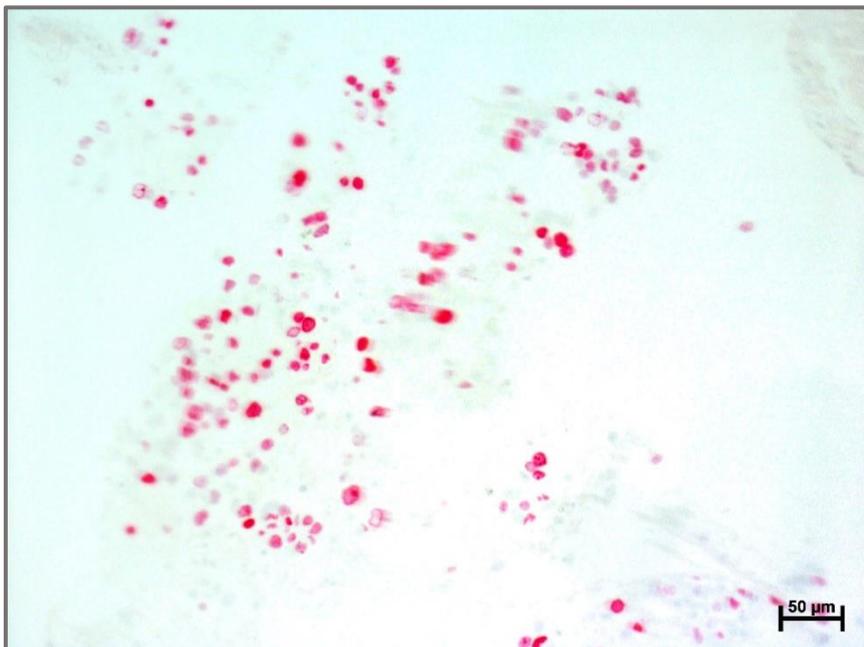


Abbildung 35: Proliferationsaktivität eines Adenokarzinoms (Histologie)

Verbände mittelgroßer atypischer Zellen mit partieller nukleärer Immunreaktivität mit dem Proliferationsmarker Ki67.
Biopsie von Lungengewebe, Immunf. gegen Ki67, Originalvergrößerung x20

Bei dem hier vorliegenden Fall handelt es sich um eine Probeentnahme aus dem linken Oberlappen.

Im Überstandspräparat lassen sich kleine, traubenförmige, epitheliale Zellgruppen mit vergrößerten, rundlichen bis ovalen, anisomorphen und hyperchromatischen Zellkernen sehen. Bei den Zellen zeigt sich außerdem ein schmaler bis mäßig breiter Zytoplasmasaum. Somit liegt ein „positiver Tumorbefund“ mit Verdacht auf ein Adenokarzinom vor (Abbildung 32).

In der Histologie zeigen sich vorwiegend mikropapilläre, teils papilläre, teils strangförmige Tumorformationen. Diese weisen, wie in der Überstandszytologie, einen vergrößerten, hyperchromatischen Zellkern und einen schmalen bis mäßig breiten Zytoplasmasaum auf. Auch hier handelt es sich um einen „positiven Befund“ (Abbildung 33).

Durch Färbungen gegen TTF-1 (Abbildung 34) und Napsin A (nicht bildlich dargestellt) des histologischen Präparats lässt sich ein Adenokarzinom bestätigen. In der Färbung gegen Ki67 lässt sich in den Tumorzellen eine Wachstumsfraktion von 40-60% bestimmen (Abbildung 35). Die Diagnosestellung des vorwiegend mikropapillären Adenokarzinoms erfolgt durch Zusammenschau von Überstandszytologie und Histologie und wird durch Immunfärbungen bestätigt.

5.3.3 Diagnosestellung anhand der Histologie bei auffälliger Überstandszytologie

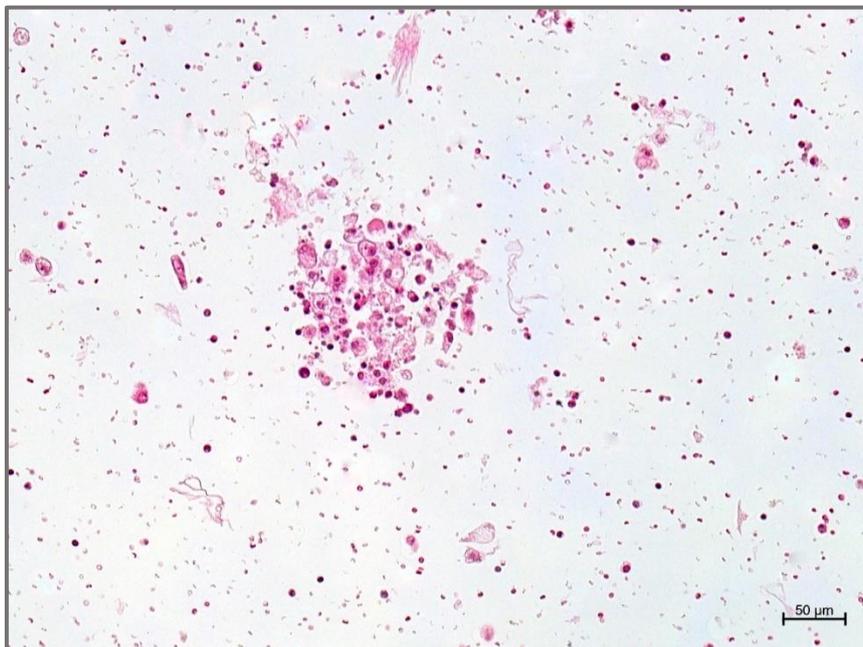


Abbildung 36: Zweifelhafter Befund (Überstandszytologie - Histogelblock)

Locker zusammengelegene mittelgroße epitheloide Zellen mit Zellkerngrößenschwankungen; ferner histiozytäre Zellen, Leukozyten und Erythrozyten.

Zytologie der Lunge, HE-Färbung, Originalvergrößerung x20

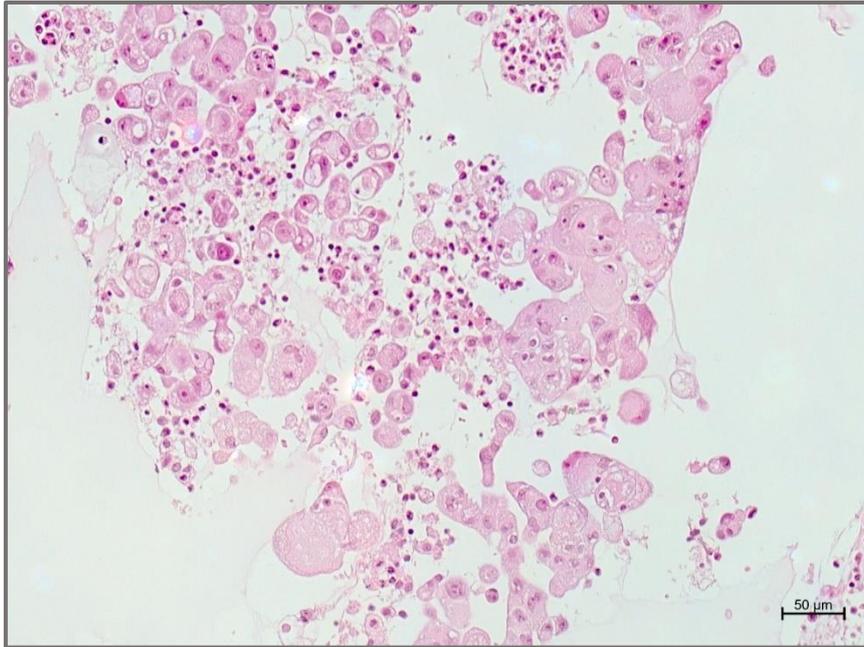


Abbildung 37: Infiltrate eines NSCLC (Histologie)

Teils einzeln liegende, teils zu Verbänden zusammengelegene mittelgroße bis große Zellen mit Anisonukleosin und angedeutet vakuolisiertem Zytoplasma.

Biopsie von Lungengewebe, HE-Färbung, Originalvergrößerung x20

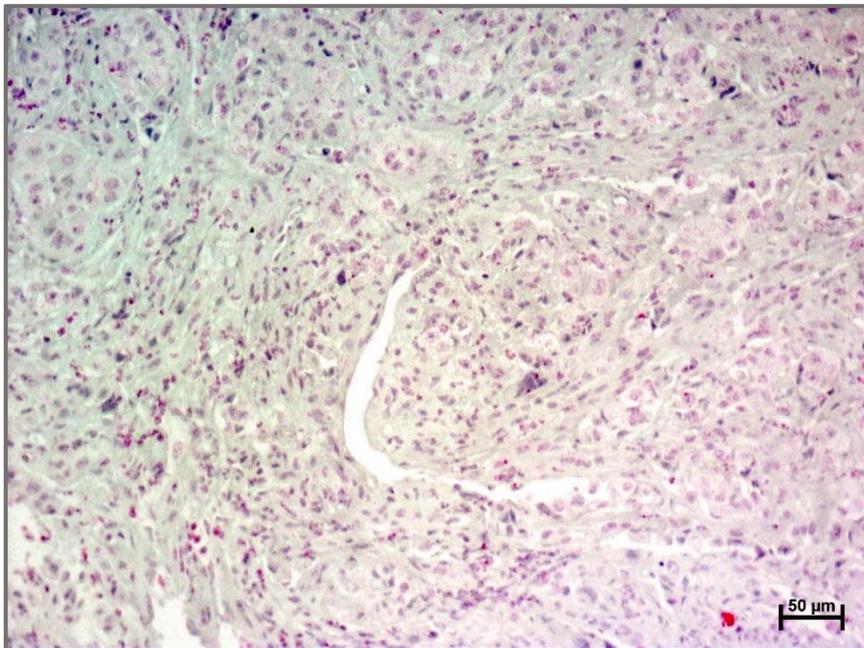


Abbildung 38: Infiltrate eines TTF-1-positiven Adenokarzinoms (Histologie)

Angedeutet drüsig differenzierte Infiltrate eines NSCLC mit nukleärer Immunreaktivität der Tumorzellen für TTF-1.

Biopsie von Lungengewebe, Immunf. gegen TTF-1, Originalvergrößerung x20

Die hier betrachtete Probe wurde aus dem rechten Oberlappen (Lokalisation RB3-Bronchus) entnommen.

Im Befund der Überstandsdiagnostik wird ein Bild von einzelnen Gruppen suspekter, mittelgroßer Zellelemente mit vergrößertem Chromatin und mittelbreitem Zytoplasmasaum zwischen Zylinderepithelien beschrieben. Der Befund der Überstandszytologie wurde deshalb auf „zweifelhaft“ festgelegt (Abbildung 36).

In der Histologie sind lymphozytäre Infiltrate und eine hyalinverbreiterte Basalmembran zu erkennen. Auch Tumorformationen aus mittelgroßen bis großen Zellen mit vergrößerten Nukleoli und schwach eosinophilem Zytoplasma sind zu finden. Dies erbringt am HE-Präparat die Diagnose eines „NSCLC“ (Abbildung 37).

Anhand der positiven Färbung gegen TTF-1 lässt sich die Diagnose eines Adenokarzinoms stellen (Abbildung 38).

5.4 Korrelation der Überstandsdiagnostik mit der Histologie

Die folgende Auswertung (Tabelle 15) bezieht sich auf Präparate in HE-Färbungen ohne Zuhilfenahme der Immunfärbungen. Carcinoma in situ werden als positiv mitgerechnet. Nicht repräsentative Präparate werden nicht betrachtet. Da beide Präparate auf der gleichen Probenentnahme basieren und somit das gleiche Grundmaterial zugrunde liegt, wird der McNemar-Test für verbundene qualitative Merkmale angewandt.

	Histologie an HE-Färbungen				Gesamt
	negativ	zweifelhaft	verdächtig	positiv	
Überstandszyt. an HE-Färbungen	negativ				
	abs. Anzahl (n)	5	0	4	60
	rel. Häufigkeit (%)	0,9%	0,0%	0,7%	10,7%
	zweifelhaft				
abs. Anzahl (n)	115	6	9	132	262
rel. Häufigkeit (%)	20,5%	1,1%	1,6%	23,5%	46,6%
verdächtig					
abs. Anzahl (n)	5	0	1	127	133
rel. Häufigkeit (%)	0,9%	0,0%	0,2%	22,6%	23,7%
positiv					
abs. Anzahl (n)	1	0	1	96	98
rel. Häufigkeit (%)	0,2%	0,0%	0,2%	17,1%	17,4%
Gesamt					
abs. Anzahl (n)	126	6	15	415	562
rel. Häufigkeit (%)	22,4%	1,1%	2,7%	73,8%	100,0%
p-Wert nach McNemar					<0,001

Tabelle 15: Ergebnis des Tests nach McNemar für Überstandszytologie und Histologie

Das Ergebnis des Tests nach McNemar zeigt einen p-Wert von $p < 0,001$. Somit zeigt sich, dass unterschiedliche Ergebnisse vorliegen und die erkennbaren Unterschiede nicht zufällig die beschriebene Verteilung zeigen.

In $n=108$ Fällen (19,2%) zeigen beide Methoden ein identisches Ergebnis an. Mit $n=415$ Fällen (73,8%) zeigt die Methode der Histologie deutlich mehr „positive“ Ergebnisse als die Methode der Überstandszytologie mit $n=98$ (17,4%).

Die häufigste Kombination ist ein „positives Ergebnis“ in der Histologie und ein „zweifelhaftes Ergebnis“ in der Überstandszytologie. Diese Kombination macht mit $n=132$ Fällen einen Anteil von 23,5% an allen betrachteten Fällen aus. In $n=1$ Fall (0,2%) zeigte die Überstandszytologie eine „positive Diagnose“ und die Histologie ein „negatives Ergebnis“. In $n=5$ (0,9%) weiteren Fällen konnte die Diagnose in der Überstandszytologie auf „verdächtig“ festgelegt werden, während die Histologie auch hier ein „negatives Ergebnis“ aufzeigt.

5.5 Auswertung eventueller Einflussfaktoren

5.5.1 Einfluss des Tumorsubtyps

5.5.1.1 Einfluss auf die Überstandszytologie

Ein wichtiger Einflussfaktor auf die Wertigkeit der Überstandszytologie könnte der Tumorsubtyp sein. Ob die Überstandszytologie bei einem bestimmten Subtyp bessere Ergebnisse liefert als bei einem anderen, wird im Folgenden durch den Chi-Quadrat-Test betrachtet. Dabei werden die Ergebnisse der Überstandszytologie, mit Ausnahme der nicht repräsentativen Proben, gegen die positiven Referenzergebnisse aufgetragen, die sich mit Überstandszytologie, Histologie, Immunfärbungen und evtl. weiteren positiven Einsendungen der gleichen Lokalisation bestimmen lassen (Tabelle 16).

	Referenzergebnis				Gesamt	
	AC	PEC	SCLC	Sonstige ¹		
Überstandszyt. an HE-Färbungen	negativ					
	abs. Anzahl (n)	22	23	8	16	69
	rel. Häufigkeit (%)	31,9%	33,3%	11,6%	23,2%	100,0%
	zweifelhaft					
abs. Anzahl (n)	53	67	28	32	180	
rel. Häufigkeit (%)	29,4%	37,2%	15,6%	17,8%	100,0%	
verdächtig						
abs. Anzahl (n)	36	40	33	21	130	
rel. Häufigkeit (%)	27,7%	30,8%	25,4%	16,2%	100,0%	
positiv						
abs. Anzahl (n)	32	31	26	9	98	
rel. Häufigkeit (%)	32,7%	31,6%	26,5%	9,2%	100,0%	
Gesamt						
abs. Anzahl (n)	143	161	95	78	477	
rel. Häufigkeit (%)	30,0%	33,8%	19,9%	16,4%	100,0%	
p-Wert nach Chi-Quadrat-Test					0,086	

Tabelle 16: Einfluss des Tumorsubtyps auf die Wertigkeit der Überstandszytologie

¹sonstige maligne Tumore inkl. NSCLC-NOS und Carcinoma in situ

Anhand des p-Wertes von $p=0,086$ ist zu erkennen, dass kein signifikanter Unterschied in der Diagnostik der Überstandszytologie in Bezug auf die Tumorsubtypen besteht.

Es sind jedoch Unterschiede erkennbar. So haben bei einer „negativen“ Überstandszytologie nur 11,6% das Referenzergebnis „SCLC“, während bei einer „positiven“ Überstandsdiagnose 26,5% das Referenzergebnis „SCLC“ aufweisen.

Ein weiteres Augenmerk liegt auf dem Referenzergebnis bei den „sonstigen malignen Tumoren“, welche mit 23,6% ein „negatives“ und mit nur 9,2% ein „positives Ergebnis“ in der Überstandszytologie zeigen.

5.5.1.1.1 Einfluss des Tumorsubtyps am Beispiel des mikropapillären Adenokarzinoms

Die mikropapillären Adenokarzinome werden hier gesondert betrachtet. Mikropapilläre Adenokarzinome wachsen in kleinen röschenförmigen Anordnungen ohne einen fibrovaskulären Kern, was eine feste Anhaftung an die Alveolarwände oftmals verhindert [29]. Daher wird geschaut, ob sich die Überstandszytologie in besonderer Weise dazu eignet diesen Tumorsubtyp zu diagnostizieren, da die Zellen der mikropapillären Adenokarzinome durch die fehlende Festigkeit leichter vom Tumor in die Überstandsflüssigkeit abschilfern könnten. Das Ergebnis der Überstandszytologie an HE-Färbungen wird dafür mit dem Ergebnis der Histologie an HE-Färbungen und entsprechenden Immunfärbungen verglichen, da sich in der Histologie ein prädominantes Wachstumsmuster bestimmen lässt.

	Diagnose Adenokarzinom in der Histologie an HE-Färbungen und Immunf.		Gesamt	
	AC, ausgenommen mikropapilläre AC	mikropapilläre AC		
Überstandszyt. an HE-Färbungen	negativ			
	abs. Anzahl (n)	21	1	22
	rel. Häufigkeit (%)	95,5%	4,5%	100,0%
	zweifelhaft			
abs. Anzahl	34	2	36	
rel. Häufigkeit (%)	94,4%	5,6%	100,0%	
verdächtig				
abs. Anzahl (n)	31	3	34	
rel. Häufigkeit (%)	91,2%	8,8%	100,0%	
positiv				
abs. Anzahl	31	1	32	
rel. Häufigkeit (%)	96,9%	3,1%	100,0%	
Gesamt				
abs. Anzahl	117	7	124	
rel. Häufigkeit (%)	94,4%	5,6%	100,0%	
p-Wert nach exaktem Test nach Fisher	0,911			

Tabelle 17: Prüfung der Wertigkeit der Überstandszytologie bei mikropapillären Adenokarzinomen

Tabelle 17 stellt die mikropapillären Adenokarzinome im Vergleich zu den anderen, stabiler wachsenden Adenokarzinomen dar. Mit einem p-Wert von $p=0,911$ ist der vorliegende Unterschied nicht signifikant, somit besteht kein relevanter Unterschied in der Verteilung der Ergebnisse betreffend die Wertigkeit der Überstandszytologie in Bezug auf die mikropapillären Adenokarzinomen im Vergleich mit der histologischen Diagnose an der HE-Färbung.

Es lässt sich jedoch erkennen, dass von den mikropapillären Adenokarzinomen in der Überstandsdiagnostik nur $n=1$ unerkannt bleibt. Somit ist $n=1$ Fall von insgesamt $n=7$ mikropapillären Adenokarzinomen in der Überstandszytologie „negativ“, dies entspricht einem Anteil von 14,3% aller mikropapillären Adenokarzinome. Von den $n=117$ anderen Subtypen der Adenokarzinome sind $n=21$ Fälle (17,9%) in der Überstandszytologie „negativ“.

5.5.1.1.2 Einfluss des Tumorsubtyps am Beispiel des SCLC

Auch der Tumorsubtyp SCLC soll gesondert betrachtet werden, da bei SCLC im Vergleich zu anderen soliden malignen Tumoren eine geringere Haftung im Zellverband vorkommt. So lassen sich beim SCLC einige aufgeschichtete Zellenhaufen und aus aufgelösten Tumorzellverbänden verstreute Tumorzellen erkennen. Durch die kurze Tumorverdoppelungszeit kommt es beim SCLC auch vermehrt zu Nekrosen, die die Tumorstabilität weiter herabsetzen [23,29]. Das Ergebnis der Überstandszytologie an HE-Färbungen wird dafür mit dem Ergebnis der Histologie an HE-Färbungen und entsprechenden Immunfärbungen als Vergleichswerte aufgetragen (Tabelle 18). Carcinoma in situ werden in der Vergleichsgruppe „alle anderen positiven Diagnosen“ als positiv mitgerechnet.

	Diagnose in der Histologie an HE-Färbungen und Immunf.		Gesamt
	SCLC	alle anderen positiven Diagnosen	
Überstandszyt. an HE-Färbungen	negativ		
	abs. Anzahl (n)	8	61
	rel. Häufigkeit (%)	11,6%	88,4%
			69
			100,0%
zweifelhaft	abs. Anzahl	24	110
	rel. Häufigkeit (%)	17,9%	82,1%
			134
			100,0%
verdächtig	abs. Anzahl (n)	32	95
	rel. Häufigkeit (%)	25,2%	74,8%
			127
			100,0%
positiv	abs. Anzahl	26	72
	rel. Häufigkeit (%)	26,5%	73,5%
			98
			100,0%
Gesamt	abs. Anzahl	90	338
	rel. Häufigkeit (%)	21,0%	79,0%
			428
			100,0%
p-Wert nach exaktem Test nach Fisher			0,050

Tabelle 18: Prüfung der Wertigkeit der Überstandszytologie bei SCLC

Zwei Fälle konnten auf Grund nicht repräsentativen Materials nicht in den Vergleich mit einbezogen werden.

Mit einem p-Wert von $p=0,05$ im exakten Test nach Fisher zeigt sich ein Wert genau auf dem festgelegten Signifikanzniveau.

So erweist sich in der Überstandszytologie bei den SCLC mit $n=26$ positiven von insgesamt 90 diagnostizierten SCLC in der Vergleichsgruppe Histologie eine positive Trefferquote von 28,9%. Die $n=26$ positiven Diagnosen setzen sich aus den zytologischen Diagnosen „SCLC“,

„kleinzelliger Tumor“ und einigen Präparaten mit der Diagnose „sonstigen malignen Tumoren“ zusammen.

Der Prozentsatz der in der Überstandszytologie als positiv erkannten malignen Tumoren liegt bei den anderen Subtypen nur bei 21,3% (n=72 von 338).

5.5.1.2 Einfluss auf den Vergleich der beiden Verfahren

Wie in Punkt 5.4 bereits ersichtlich ist, besteht ein signifikanter Unterschied zwischen der Überstandszytologie und der Histologie. Nun ist zu prüfen, ob ein bestimmter Tumorsubtyp in einem der beiden Verfahren besser zu erkennen ist.

Dabei werden in Tabelle 19 das beste positive Ergebnis, das mit Histologie, Überstandszytologie und Immunfärbungen des jeweiligen Falles oder weiteren Einsendungen bestimmt werden kann, mit der Methode mit dem höherwertigeren Ergebnis in der HE-Färbung verglichen.

	Referenzergebnis				Gesamt
	AC	PEC	SCLC	Sonstige ¹	
Überstandszytologie höherwertiger					40
abs. Anzahl (n)	16	13	5	6	100,0%
rel. Häufigkeit (%)	40,0%	32,5%	12,5%	15,0%	
Beide zeigen gleiche Diagnose					107
abs. Anzahl (n)	34	31	28	14	100,0%
rel. Häufigkeit (%)	31,8%	29,0%	26,2%	13,1%	
Histologie höherwertiger					329
abs. Anzahl (n)	93	117	61	58	100,0%
rel. Häufigkeit (%)	28,3%	35,6%	18,5%	17,6%	
Vergleich nicht möglich²					2
abs. Anzahl (n)	1	0	1	0	100,0%
rel. Häufigkeit (%)	50,0%	0,0%	50,0%	0,0%	
Gesamt					478
abs. Anzahl (n)	144	161	95	78	100,0%
rel. Häufigkeit (%)	30,1%	33,7%	19,9%	16,3%	
p-Wert nach exaktem Test nach Fisher					0,325

Tabelle 19: Vergleich der beiden Verfahren in Bezug zum besten erreichten Ergebnis

¹sonstige maligne Tumore inkl. NSCLC-NOS und Carcinoma in situ; ²bei einer der beiden Methoden liegt kein repräsentatives Material vor

Bei der Kategorie „Plattenepithelkarzinome“ zeigt die Überstandsdiagnostik in 32,5% ein höherwertigeres Ergebnis als die Histologie und liegt somit nur 0,8% unter dem Erwartungswert.

In der Kategorie „Adenokarzinome“ zeigt die Überstandszytologie hingegen mit 40% öfter ein höherwertiges Ergebnis als die Histologie mit 28,3%. Dies zeigt, dass die Überstandszytologie in der Kategorie „Adenokarzinome“ häufiger ein besseres Ergebnis zeigt, als man laut Test erwarten würde.

Allerdings zeigt sich mit einem Signifikanzwert von $p=0,325$, dass sich an keiner der beiden Methoden ein bestimmter Tumorsubtyp signifikant besser diagnostizieren lässt.

5.5.2 Einfluss des Gradings

5.5.2.1 Einfluss des Gradings auf die Überstandszytologie

Um einschätzen zu können, ob der Differenzierungsgrad der Karzinome einen Einfluss auf die Wertigkeit der Überstandszytologie hat, wird geprüft, ob die Überstandszytologie abhängig vom histologisch bestimmten Grading des Tumors eine spezifischere Diagnose erlaubt.

Bei der Auftragung der Gradinggruppen G1-G4 gegen die Ergebniskategorien „negativ“, „zweifelhaft“, „verdächtig“ und „positiv“ der Überstandszytologie zeigte sich nach dem exakten Test nach Fisher mit einem p-Wert von 0,356 kein signifikanter Unterschied.

Da die Gradingstufe G4 größtenteils aus SCLC besteht ($n=90$ und $n=4$ sonstige maligne Tumoren) kann es lohnend sein, den Einfluss des Gradings auf die übrigen Fälle, vor allem NSCLC, unter Aussparung der Gruppe G4 zu betrachten (Tabelle 20).

		Grading			Gesamt
		G1	G2	G3	
Überstandszyt. an HE-Färbungen	negativ				
	abs. Anzahl (n)	2	13	35	50
	rel. Häufigkeit (%)	4,0%	26,0%	70,0%	100,0%
	zweifelhaft				
abs. Anzahl (n)	1	24	73	98	
rel. Häufigkeit (%)	1,0%	24,5%	74,5%	100,0%	
verdächtig					
abs. Anzahl (n)	1	18	63	82	
rel. Häufigkeit (%)	1,2%	22,0%	76,8%	100,0%	
positiv					
abs. Anzahl (n)	1	15	49	65	
rel. Häufigkeit (%)	1,5%	23,1%	75,4%	100,0%	
Gesamt					
abs. Anzahl (n)	5	70	220	295	
rel. Häufigkeit (%)	1,7%	23,7%	74,6%	100,0%	
p-Wert nach exaktem Test nach Fisher					0,897

Tabelle 20: Einfluss des Gradings auf die Wertigkeit der Überstandszytologie

Auch bei der Auftragung der Gradinggruppen G1-G3 gegen die Ergebniskategorien der Überstandszytologie zeigt sich mit einem p-Wert von 0,897 kein signifikanter Unterschied in Bezug auf den Einflussfaktor Grading.

5.5.2.2 Einfluss des Gradings auf den Vergleich der beiden Verfahren

Auch hier soll eine Prüfung in Hinsicht auf eventuelle Vorteile einer der beiden Methoden erfolgen. Dies ist in Tabelle 21 dargestellt.

		Grading				Gesamt
		G1	G2	G3	G4	
Vergleich der Verfahren an HE-Färbungen	Überstandszytologie höherwertiger abs. Anzahl (n) rel. Häufigkeit (%)	0 0,0%	0 0,0%	2 66,7%	1 33,3%	3 100,0%
	Beide zeigen gleiche Diagnose abs. Anzahl (n) rel. Häufigkeit (%)	1 1,1%	17 17,9%	49 51,6%	28 29,5%	95 100,0%
	Histologie höherwertiger abs. Anzahl (n) rel. Häufigkeit (%)	4 1,4%	53 18,2%	169 58,1%	65 22,3%	291 100,0%
	Gesamt abs. Anzahl (n) rel. Häufigkeit (%)	5 1,3%	70 18,0%	220 56,6%	94 24,2%	389 100,0%
p-Wert nach exaktem Test nach Fisher						0,734

Tabelle 21: Vergleich der beiden Verfahren im Bezug zum Grading

Mit einem p-Wert von $p=0,734$ wird deutlich, dass auch das Grading keinen Einfluss darauf hat, welches der beiden Verfahren die sensitivere Methode ist.

5.5.3 Einfluss der Entnahmelokalisation

5.5.3.1 Einfluss der Entnahmelokalisation auf die Überstandszytologie

Um aufzuzeigen, welchen Einfluss die Lokalisation auf Wertigkeit der Überstandsdiagnostik hat, werden in den exakten Tests nach Fisher alle Proben eingebunden, bei denen man die genaue Lokalisation bestimmen kann. Dies wird im Anhang in Punkt 12.2.3 tabellarisch dargestellt.

Durch p-Werte von $p=0,099/0,054/0,737$ wird deutlich, dass die Entnahmelokalisation keinen signifikanten Einfluss auf die Wertigkeit der zytologischen Überstandsdiagnostik hat. Dabei haben weder die Lungenseite noch die einzelnen Lungenlappen einen signifikanten Einfluss auf die Ergebnisse der Überstandszytologie.

5.5.3.2 Einfluss der Entnahmelokalisation auf den Vergleich der beiden Verfahren

Analog zu den anderen Einflussfaktoren folgt eine Analyse, ob eines der beiden Verfahren Vorteile bei einer bestimmten Lokalisation birgt.

Bei der Prüfung, ob eine bestimmte Entnahmelokalisation in einem der beiden Verfahren einen Vorteil birgt, wird durch die p-Werte von $p>0,1$ ($p= 0,105/0,694/0,679$) deutlich, dass keine Lokalisation einen deutlichen Benefit hat. Eine ausführliche Aufstellung findet sich im Anhang (Punkt 12.2.4).

5.6 Auswertung der auffälligen Überstandszytologie

Wie in Punkt 5.2.5 bereits dargestellt, zeigen sich einige Überstandspräparate als „auffällig“ und in Anbetracht weiterer Proben und der Histologie können diese Auffälligkeiten in einigen Fällen auf einen malignen Tumor hinweisen, während andere fälschlicherweise auffällig waren.

Jetzt ist zu prüfen, ob eine höhergradige Auffälligkeit, also „verdächtig“, deutlicher auf einen Tumor hinweist als eine niedriggradigere Auffälligkeit, wie „zweifelhaft“.

		Kann die Auffälligkeit bestätigt werden?				Gesamt
		Tumor widerlegt ¹	Tumor bestätigt ²	Tumor an gleicher Lokalisation ³	Tumor an anderer Lokalisation ⁴	
Überstandszyt. an HE-Färbungen	zweifelhaft abs. Anzahl (n) rel. Häufigkeit (%)	54 20,5%	133 50,6%	46 17,5%	30 11,4%	263 100,0%
	verdächtig abs. Anzahl (n) relative Häufigkeit (%)	3 2,3%	127 95,5%	2 1,5%	1 0,8%	133 100,0%
Gesamt abs. Anzahl (n) rel. Häufigkeit (%)		57 14,4%	260 65,7%	48 12,1%	31 7,8%	396 100,0%
p-Wert nach exaktem Test nach Fisher						<0,001

Tabelle 22: Auswertung der auffälligen Überstandszytologie in Bezug auf andere Proben

¹Tumorverdacht durch Immunfärbungen widerlegt/in weiteren Einsendungen auch kein maligner Tumor; ²Tumorverdacht durch Histologie/Immunfärbungen bestätigt; ³maligner Tumor in anderer Einsendung an gleicher Lokalisation; ⁴maligner Tumor in anderer Einsendung in anderer Lokalisationsgruppe

Mit einem p-Wert von $p < 0,001$ wird in Tabelle 22 deutlich, dass zwischen den unterschiedlichen Auffälligkeitsgraden und der Diagnostik eines malignen Tumors ein signifikanter Unterschied vorliegt.

So werden „zweifelhafte Befunde“ mit 20,5% häufiger durch die Histologie oder Immunfärbungen widerlegt als „verdächtige Befunde“ mit 2,3%. Dafür werden die „verdächtigen Befunde“ häufiger durch die Histologie oder Immunfärbungen bestätigt, als dies bei den „zweifelhaften Befunden“ der Fall ist.

Weitere Abweichungen der erwarteten Werte finden sich bei der Kategorie „zweifelhaft“, bei der mit 17,5% häufiger ein maligner Tumor an der gleichen Stelle gefunden werden konnte als in der Kategorie „verdächtig“ mit 1,5%.

5.7 Vergleich Histogelblock-Paraffinblock am Beispiel von BRAS

5.7.1 Probenkollektiv

In diesem Punkt wurden insgesamt je 200 BRAS-Präparate der Aufarbeitungsmethode als Paraffinblöcke und als zytologische Histogelblöcke verglichen. Dabei wurde als Referenzmethode ebenfalls der Goldstandard einer entsprechenden histologischen Probe mit passenden Immunfärbungen angewandt. Es wurden nur Fälle verwendet, die in der Histologie eine positive Diagnose gezeigt haben.

Um eine gute Vergleichbarkeit zu erlangen, wurden pro Versuchsgruppe Fälle ausgesucht, die in der Histologie und deren Immunfärbungen je 80 Adenokarzinome, 80 Plattenepithelkarzinome und 40 SCLC zeigten. Es wurden dabei in jeder Tumorart zufällig Paare aus je einem Ergebnis mit und ohne Histogelblock gebildet.

Ziel dieses Vergleichs war eine Abwägung, ob eine Aufarbeitung als Paraffinblock oder als zytologischer Histogelblock des BRAS-Materials eine bessere Diagnosestellung erlaubt und diese Methode dann auch in der Überstandsdagnostik angewandt werden kann.

5.7.2 Diagnosestellung im Vergleich Paraffinblock versus zytologischer Histogelblock

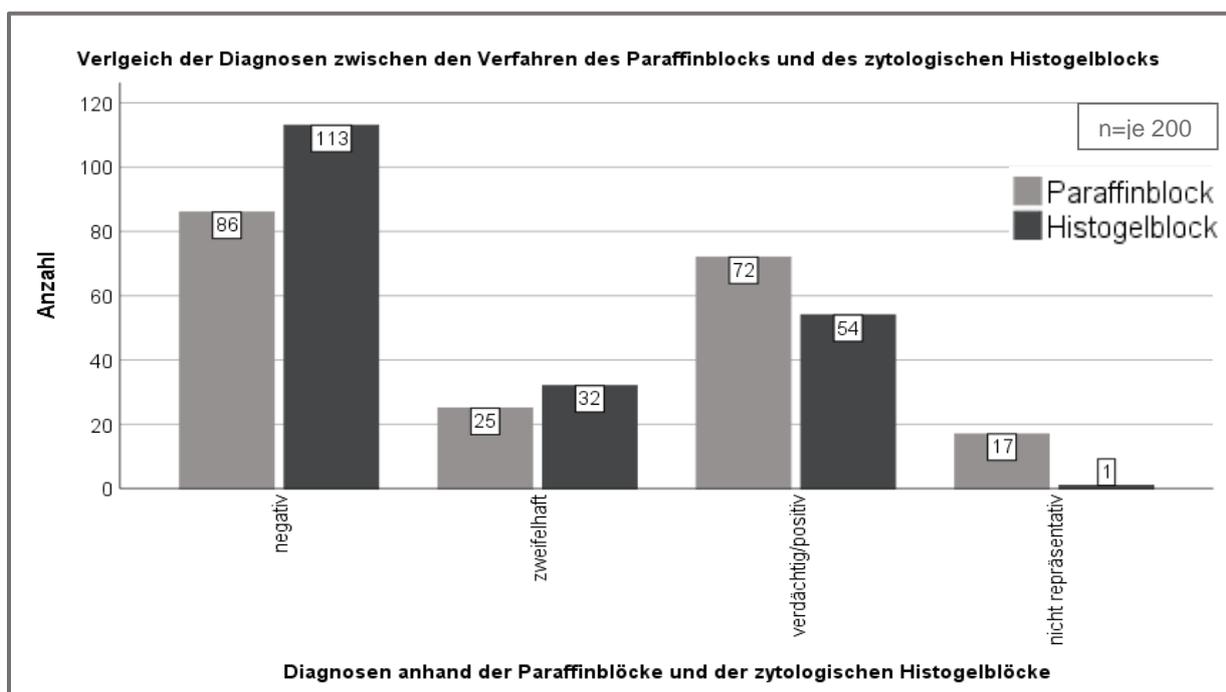


Abbildung 39: Häufigkeitsverteilung der Diagnosen an BRAS-Präparaten der beiden zytologischen Verfahren Paraffinblock und zytologischer Histogelblock

Das Diagramm zeigt die Ergebnisse, die durch die HE-Färbungen an BRAS-Präparaten mit der Methode des Paraffinblocks und des zytologischen Histogelblocks gestellt werden konnten. Es wurden je $n=200$ Präparate betrachtet.

In Abbildung 39 zeigt sich, dass die größte Gruppe bei beiden Verfahren die Gruppe „negativ“ darstellt. Die zweitgrößte Gruppe ist die Gruppe „verdächtig/positiv“, die deutliche Hinweise auf einen malignen Tumor gibt, bzw. die Diagnosestellung erlaubt. So konnten mit der Methode des Paraffinblocks insgesamt in n=72 Fällen und mit der Methode des zytologischen Histogelblocks in n=54 Fälle eine verdächtige oder positive Tumordiagnose gestellt werden.

	Histologie mit Immunf.			Gesamt
	AC (n=80)	PEC (n=80)	SCLC (n=40)	
negativ				
Histogelblock	46 (23,0%)	40 (20%)	27 (13,5%)	113 (56,5%)
Paraffinblock	36 (18,0%)	32 (16%)	18 (9,0%)	86 (43,0%)
zweifelhaft				
Histogelblock	14 (7,0%)	11 (5,5%)	7 (3,5%)	32 (16,0%)
Paraffinblock	8 (4,0%)	9 (4,5%)	8 (4,0%)	25 (12,5%)
verdächtig				
Histogelblock	8 (4,0%)	3 (1,5%)	3 (1,5%)	14 (7,0%)
Paraffinblock	11 (5,5%)	4 (2,0%)	3 (1,5%)	18 (9,0%)
NSCLC				
Histogelblock	8 (4,0%)	18 (9,0%)	0 (0,0%)	26 (13,0%)
Paraffinblock	16 (8,0%)	21 (10,5%)	1 (0,5%)	38 (19,0%)
AC				
Histogelblock	4 (2,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	4 (2,0%)
Paraffinblock	4 (2,0%)	1 (0,5%)	0 (0,0%)	5 (2,5%)
PEC				
Histogelblock	0 (0,0%)	8 (4,0%)	0 (0,0%)	8 (4,0%)
Paraffinblock	0 (0,0%)	5 (2,5%)	0 (0,0%)	5 (2,5%)
SCLC				
Histogelblock	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (1,0%)	2 (1,0%)
Paraffinblock	0 (0,0%)	0 (0,0%)	6 (3,0%)	6 (3,0%)
nicht repräsentativ				
Histogelblock	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (0,5%)	1 (0,5%)
Paraffinblock	5 (2,5%)	8 (4,0%)	4 (2,0%)	17 (8,5%)
Gesamt (jeweils)	80 (40,0%)	80 (40,0%)	40 (20,0%)	200 (100,0%)

Tabelle 23: Häufigkeitsverteilung der Diagnosen der BRAS-Präparate an HE-Färbungen im Vergleich zur Histologie

In der obigen Tabelle (Tabelle 23) zeigt sich, dass sich mit den Präparaten aus den Paraffinblöcken insgesamt n=54 (27,0%) positive Diagnosen stellen lassen, während es bei den Präparaten aus den Histogelblöcken nur n=40 (20,0%) sind. Dies entspricht 7,0% mehr positiven Diagnosen. Auch verdächtige Fällen zeigen sich häufiger im Paraffinblockpräparat als im Präparat, welches mit Histogel angefertigt wurde.

Jedoch zeigen die Präparate aus den Paraffinblöcken mit n=17 (8,5%) deutlich öfter nicht repräsentative Fälle als die Histogelpräparate mit nur n=1 (0,5%) Fall, was einem Unterschied von 8,0% entspricht.

Durch das Vorhandensein von Verhornungen können Plattenepithelkarzinome in beiden zytologischen Verfahren häufiger direkt als solche klassifiziert werden, während bei Adenokarzinomen und unverhornten Plattenepithelkarzinom eine Differenzierung am HE-Präparat anhand der Zellmorphologie und Kern- oder Chromatintypen in den zytologischen Methoden erschwert ist. Hier wird häufiger nur die Diagnose eines NSCLC-NOS gestellt.

5.7.2.1 Korrelation der beiden Verfahren

	BRAS-Präparat aus Histogelblock					Gesamt
	negativ	zweifelhaft	verdächtig	positiv	nicht repräsentativ	
negativ						
abs. Anzahl (n)	47	18	3	8	1	86
rel. Häufigkeit (%)	54,7%	20,9%	3,5%	9,3%	1,2%	100,0%
zweifelhaft						
abs. Anzahl (n)	16	3	1	5	0	25
rel. Häufigkeit (%)	64,0%	12,0%	4,0%	20,0%	0,0%	100,0%
verdächtig						
abs. Anzahl (n)	10	2	1	5	0	18
rel. Häufigkeit (%)	55,6%	11,1%	5,65%	27,8%	0,0%	100,0%
positiv						
abs. Anzahl (n)	29	6	3	16	0	54
rel. Häufigkeit (%)	53,7%	11,1%	5,6%	29,6%	0,0%	100,0%
nicht repräsentativ						
abs. Anzahl (n)	11	3	1	2	0	17
rel. Häufigkeit (%)	64,7%	17,6%	5,9%	11,8%	0,0%	100,0%
Gesamt						
abs. Anzahl (n)	113	32	14	40	1	200
rel. Häufigkeit (%)	56,5%	16,0%	7,0%	20,0%	0,5%	100,0%
p-Wert nach Chiquadrat-Test						0,811

Tabelle 24: Korrelation zwischen den Verfahren des Histogelblocks und des Paraffinblocks

Mit einem p-Wert von $p=0,811$ zeigt sich in Tabelle 24, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Methoden besteht und somit keines der Verfahren einen relevanten Vorteil gegenüber dem anderen Verfahren vorweist.

6 Diskussion

6.1 Patientenkollektiv

Diese Arbeit umfasst Proben von 564 Patienten, davon waren 37,4% (n=211) Frauen und 62,6% (n=353) Männer. Betrachtet man die Fälle, in denen definitiv ein maligner Lungentumor oder Carcinoma in situ diagnostiziert werden konnte - entsprechend n=430 Fälle - ergibt sich eine Verteilung von 36,7% (n=158) maligner Tumordiagnosen für Frauen und 63,3% (n=272) für Männer.

Zahlen des Robert-Koch-Instituts aus dem Jahr 2013 zeigten eine Neuerkrankung an malignen Lungentumoren von 18 810 Frauen und 34 500 Männern auf [41]. Dies entspricht einem Anteil von 35,3% aller Neuerkrankten bei Frauen und 64,7% bei Männern.

Bei dem dieser Arbeit zugrunde liegenden Kollektiv handelt es sich somit, unter dem Aspekt der Geschlechterverteilung im Vergleich zu bereits vorliegenden Daten, um eine repräsentative Kohorte.

Mit einem durchschnittlichen Alter von 64,3 Jahren bei Frauen zu 65,9 Jahren bei Männern liegt das Alter bei Biopsieentnahme im Vergleich zu den Daten des Robert-Koch-Instituts (2016) etwas niedriger. So wurde in deren Bericht zum Krebsgeschehen ein mittleres Erkrankungsalter von 68,3 Jahren für Frauen und 69,3 Jahren für Männer beschrieben [41].

Die unterschiedlichen Zahlen hinsichtlich des Erkrankungsalters können mit dem Krankengut des hiesigen Universitätsklinikums zusammenhängen und/oder durch die Einbeziehung von klinischen Verdachtsfällen einer malignen Lungentumorerkrankung bedingt sein, die sich nicht in allen Fällen bestätigen ließ.

Die Tendenz, dass untersuchte Frauen des vorliegenden Patientenkollektivs im Mittel etwas jünger als untersuchte Männer sind, zeigt sich aber auch in den hier vorliegenden Daten.

6.2 Methodenvergleich

6.2.1 Bearbeitung der Überstandszytologie

Die Aufarbeitung der Überstandsflüssigkeit im Institut für Pathologie des UKS orientiert sich an der Verarbeitung anderer, bereits etablierten zytologischen Lungenproben wie BAL oder BRAS. Da man bei diesen Probenarten mit der in Punkt 4.2.2 beschriebenen Färbemethoden gute Erfahrungen gesammelt hat, werden die Überstände der Biopsien und auch die BRAS-Präparate analog mit den gleichen Schemata bearbeitet, was bei einer guten Probenqualität und -menge auch zu einem repräsentativen und gut differenzierbaren Zellbild führt. Auch S. Schröder und T. Günther bereiteten ihre Überstandspräparate für die Soordiagnostik in ähnlicher Weise auf und konnten dadurch in n=89 von n=150 Fällen in der Überstandsdiagnostik wesentlich häufiger ein positives Ergebnis erzielen als in der herkömmlichen Präparation [45].

6.2.2 Vergleich der Einteilung in Kategorien

6.2.2.1 Befundkategorien

Die zytopathologischen Befunde werden im Institut für Pathologie des UKS in fünf Stufen eingeteilt, die zur besseren Vergleichbarkeit für diese Arbeit auf die histologischen Befunde übertragen wurden.

Die Einteilung in die Kategorien „negativ“; „zweifelhaft“; „verdächtig“; „positiv“ und „nicht repräsentativ“ ist in wissenschaftlichen Arbeiten der Zytopathologie etabliert. So teilte S. Osche in seiner Dissertation über die Lungenzytologie bei der Malignomsuche in folgende Gruppen ein: „für einen Tumor nicht diagnoseweisend (keine Tumorzellen)“; „unklares Zellbild“; „Verdacht auf Tumorzellen“; „mit malignen Tumorzellen (sicher positiv)“ und „unzureichendes Material“ [34]. Des Weiteren lag auch der Dissertation von I. Born über die zytologischen Lungenkarzinomdiagnostik eine fünfstufige Einteilung zu Grunde: „negativ“; „zweifelhaft“; „dringend verdächtig“; „positiv“ und „unzureichend“ [11]. Auch international werden entsprechende Kategorien zur Einteilung zytologischer Proben diskutiert. So beschäftigte sich auch das 42. Treffen des European Congress of Cytology in Malmö 2019 mit diesem Thema und prüften dabei eine 6-stufige Einteilung der zytologischen Präparate in „nicht diagnostisch verwertbar“, „negativ“, „atypisch“, „neoplastisch - benigne oder low-grade Neoplasie“, „verdächtig“ und „positiv für Malignität“ [15].

K. Hiroshima und Mitarbeiter befassten sich ebenfalls mit diesem Thema. Sie prüften dabei eine drei-, vier- und fünfstufige Kategorisierung und kamen zu der Empfehlung eine vierstufige Einteilung mit den Kategorien „keine Malignität“, „atypische Zellen“, „verdächtig auf Malignität“ und „maligne Zellen“ zu nutzen [24].

6.2.2.1.1 Nicht repräsentative Präparate

S. Osche beschrieb in seiner Dissertation einen Anteil von ca. 1% der Proben als „unzureichend für eine Diagnose hinsichtlich des enthaltenen Zellmaterials“ [34]. In der vorliegenden Arbeit wird von den 564 zytologischen Proben nur n=1 (je ca. 0,2%) Probe aufgrund der Quantität und Qualität des Zellmaterial als „nicht repräsentativ“ beschrieben.

6.2.2.2 Lokalisation

Ähnlich wie in der Literatur (wie z. B. bei Bubendorf et al. [14]) erfolgte die zytopathologische Auswertung unter Berücksichtigung zentraler sowie peripherer Entnahmestellen. Bereits aus der konventionellen Zytologie ist bekannt, dass in zentralen Bereichen eine höhere Trefferquote erreicht werden kann, als bei peripherer Tumormanifestation. So konnte Bubendorf et al. bei zentralen Bürstenabstrichen eine Sensitivität von 70% und in peripheren Lokalisationen je nach untersuchtem Lungenlappen eine Sensitivität von 35-60% feststellen [14].

Unter Anwendung der Überstandszytologie konnten sowohl in zentralen als auch in peripheren Bereichen bei jeweils ca. 40% der Fälle eine positive oder verdächtige zytopathologische Diagnose gestellt werden.

6.2.2.3 Grading

Das Grading der häufigsten Karzinome der Lunge wird nach internationalen Konventionen unterschiedlich für pulmonale Adenokarzinome und pulmonale Plattenepithelkarzinome vorgenommen.

Die Adenokarzinome werden jeweils, auch in den WHO-Klassifikationen, nach dem prädominanten Wachstumsmuster bewertet und auf Basis der Histologie den Gradingstufen G1 bis G4 zugeordnet [7,8,29,48,50]. Die so ermittelten Gradingstufen sind prognoserelevant [8,29].

Zur Einteilung der Plattenepithelkarzinome wurde ein klassisches dreistufiges System verwendet, welches sich im Wesentlichen an den zytopathologischen Parametern „Grad der Verhornung“ und dem „Vorhandensein von Interzellularbrücken“ orientiert [7,19].

Das histologische Grading der Plattenepithelkarzinome wurde in den letzten Jahren von W. Weichert et al. und K. Kadota et al. detailliert und prognoseorientiert untersucht, dabei stellten sich die Faktoren Tumornestgröße, Einzelzellinvasion und das sogenannte „budding“ als wichtige neue prognostische Parameter heraus. Hierfür gibt es allerdings noch kein festgelegtes Korrelat, das für zytopathologische Proben angewandt werden kann [26,53]

Kleinzellige Bronchialkarzinome werden aufgrund ihres schlecht differenzierten Wachstums-musters und der schnellen Tumorverdoppelungszeit als high-grade Tumore bezeichnet. Sie werden deshalb direkt der Gradingstufe „G4“ zugeordnet [7,23]. Diese Zuteilung zum Grading „G4“ der SCLC wurde auch in der vorliegenden Arbeit angewandt.

6.3 Klinische und morphologische Standardparameter

6.3.1 Verteilung der Tumorarten auf Männer und Frauen

Im Gesamtkollektiv aller positiven histo- und zytopathologischen Fälle (n=430) machen Adenokarzinome einen Anteil von 29,3%, Plattenepithelkarzinome einen Anteil von 34,4% und SCLC einen Anteil von 20,9% aus. Die übrigen 15,4% ergeben sich aus Carcinoma in situ, NSCLC-NOS und sonstigen malignen Tumoren.

Bei den Frauen gehören 32,2% zu den Adenokarzinomen, 22,8% zu den Plattenepithelkarzinomen und 24,1% zu den SCLC. Bei den Männern hingegen zeigen die Adenokarzinome einen Anteil von 27,6%, die Plattenepithelkarzinom einen Anteil von 41,2% und die SCLC einen Anteil von 19,1%. Die übrigen malignen Tumore, entsprechend 20,9% bei Frauen und 12,1% bei Männern, fallen in die Gruppe der sonstigen malignen Tumore, die nicht den drei Gruppen zugeordnet werden können.

Zusammenfassende Literaturberichte geben die Inzidenz der Subtypen wesentlich ungenauer an und berichten über einen Anteil von 10-30% von Plattenepithelkarzinomen bei Frauen und 30-50% bei Männern [3,25]. Bei Adenokarzinomen zeigt sich eine Verteilung von ca. 18-60% bei Frauen und mit ca. 14-27% geringere Werte bei Männern [3,25,43].

Auch die SCLC weisen eine unterschiedliche Verteilung in Bezug auf die Geschlechter auf. So kommen sie mit einem Anteil von 17-34% bei Frauen und 12-20% bei Männern vor [3,25].

6.3.2 Verteilung der einzelnen Tumorarten auf ihre Lokalisation

Der bevorzugte Wachstumsort von Adenokarzinomen ist die Lungenperipherie [29], was sich in der Auswertung dieser Arbeit ebenfalls zeigt (Tabelle 25).

n=105 (35,0%) der in der Lungenperipherie diagnostizierten Tumoren (n=300) waren Adenokarzinome. Dies stimmt gut mit den Angaben von W. Böcker et al. überein, welche eine Häufigkeit von 30-40% für periphere Adenokarzinome beschrieben [6].

In zentraleren Bereichen werden bevorzugt Plattenepithelkarzinome und kleinzellige Karzinome, welche laut W. Böcker et al. zusammen 60-70% aller zentral wachsenden malignen Tumore ausmachen, nachgewiesen [6]. Die hier ermittelten Zahlen zeigen einen Anteil von 44,8% (n=56) für Plattenepithelkarzinome und 26,4% (n=33) für kleinzellige Karzinome der zentral liegenden malignen Tumore, was zusammen einen Anteil von 71,2% ergibt.

Lokalisation	Bestes erreichtes positives Ergebnis aus Überstandszytologie, Histologie und Immunfärbungen				Gesamt
	AC	PEC	SCLC	Sonstige ¹	
peripher					
abs. Anzahl (n)	105	89	57	49	300
rel. Häufigkeit (%)	35,0%	29,7%	19,0%	16,3%	100,0%
zentral					
abs. Anzahl (n)	20	56	33	16	125
rel. Häufigkeit (%)	16,0%	44,8%	26,4%	12,8%	100,0%

Tabelle 25: Verteilung der Tumorsubtypen in den zentralen und peripheren Lungenbereich

Insgesamt konnten $n=430$ positive Diagnosen gestellt werden, bei $n=5$ positiven Proben konnte die Lokalisation nicht genau bestimmt werden, weshalb sie hier nicht aufgeführt werden.

¹ sonstige maligne Tumore inkl. NSCLC-NOS und Carcinoma in situ

Auch in Bezug auf die Verteilung der Probeentnahmen auf die einzelnen Lungenlappen finden sich in anderen Arbeiten vergleichbare Werte. Für den folgenden Vergleich werden nur die in den Lappen liegenden malignen Tumore herangezogen.

Die retrospektive Arbeit von V. Boosarngsuk et al., die Fälle von Patienten mit unklaren Raumforderungen im Röntgenbild untersuchten, gab für den linken Lungenoberlappen eine relative Häufigkeit von 23,2% an, während in der vorliegenden Arbeit 25,0% dieser Lokalisation entstammten. Aus dem linken Lungenunterlappen wurden in der vorliegenden Arbeit mit 19,8% häufiger Proben entnommen (V. Boosarngsuk et al. 13,8%). Auch im rechten Mittellappen wurden laut Daten der vorliegenden Arbeit mit einer relativen Häufigkeit von 9,0%, 2,6% mehr Proben entnommen als in der oben genannten Arbeit. Beim rechten Ober-, bzw. Unterlappen hingegen wurden bei V. Boosarngsuk et al. mit 37,7%, bzw. 19,3% um 8,4% bzw. 2% mehr Proben entnommen [10].

6.4 Einflussfaktoren auf die Überstandszytologie

In der vorliegenden Arbeit wird die Histologie als direkte Bezugs- und Vergleichsgröße herangezogen. Sie ist als Goldstandard der zytopathologischen Diagnostik maligner Lungentumoren etabliert und wurde z. B. zur vergleichenden Diagnostik von Sputumproben, Bronchialwäschen, Bürstenabstichen, Feinnadelaspirationen und BAL genutzt [5,17,46].

6.4.1 Abhängigkeit von der histologischen Probeentnahme

Die Überstandszytologie hängt direkt mit der Biopsieentnahme zusammen, da sich der Materialursprung in beiden Fällen auf eine Probenlokalisierung zurückführen lässt. Aufgrund dieses Zusammenhangs muss bedacht werden, dass ohne eine Biopsieentnahme auch keine zytologische Überstandsdiagnostik möglich ist. Daher eignet sich die Überstandsdiagnostik nicht zur alleinigen Durchführung und Diagnostik. Des Weiteren unterliegt die Überstandsdiagnostik den gleichen Begrenzungen und Einschränkungen, die bei der histologischen Probeentnahme mit dem Bronchoskop entstehen. Dies beinhaltet z. B., dass auf Grund des Durchmessers des Bronchoskopieschlauchs nur Bronchien bis zur 3.-5. Aufzweigung betrachtet und Proben entnommen werden können [51]. Auch die Erfahrung des Untersuchers spielt bei der bronchoskopisch histologischen Probengewinnung eine Rolle [51].

Allerdings erhält man durch die Überstandsdiagnostik eine weitere Möglichkeit, eine Läsion/einen Tumor zu diagnostizieren, ohne eine zusätzliche Maßnahme am Patienten durchführen zu müssen. Diagnostische Zusatzinformationen können gewonnen werden, ohne zusätzliche Risiken für den Patienten mit sich zu bringen.

6.4.2 Einfluss der Tumorsubtypen

Die Überstandszytologie zeigte bei keinem der bei uns untersuchten Tumorsubtypen einen statistisch eindeutigen Benefit ($p=0,086$). Jedoch zeigt sich die Tendenz, dass die zytologische Überstandsdiagnostik in geringem Maße bei den Adenokarzinomen mehr positive Tumordiagnosen ermöglichte. In höherem und signifikantem Ausmaß konnten im Vergleich von SCLC versus alle anderen positiven Diagnosen durch die Überstandsdiagnostik die Diagnose SCLC gestellt werden ($p=0,05$).

Sucht man nun Parallelen in anderen Arbeiten, so betrachteten S. Okachi et al. die Einflussfaktoren, die auf das Ergebnis einer EBUS-GS gesteuerten Biopsieentnahme einwirken. Hierbei war es besonders wichtig, dass eine Biopsieentnahme in der Mitte der entsprechenden Läsion erfolgen konnte. Insignifikant war die Lokalisation in der Lunge, die Anzahl der Biopsieentnahmen und der histologische Subtyp [33].

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von S. Okachi et al. in Bezug auf den Einfluss der Tumorsubtypen konnten L. DiBonito et al. ein anderes Ergebnis aufweisen. Am Autopsiematerial

konnte die Arbeitsgruppe um L. DiBonito zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen dem Tumorsubtyp und der Treffsicherheit der zytologischen Untersuchungen (BRAS) besteht. Für SCLC wiesen sie eine 100% Treffsicherheit nach, während diese bei Plattenepithelkarzinomen nur bei 90% und bei Adenokarzinom nur bei 70% lag [20].

Auch L. Bubendorf et al. publizierten ähnliche Ergebnisse für die Diagnosestellung verschiedener zytologischer Methoden in Bezug auf die Tumortypisierung. So beschreiben sie mit ca. 90% ebenfalls eine hohe Rate an korrekten Zuordnungen der SCLC und der verhornenden Plattenepithelkarzinome. Die weiteren malignen Tumorsubtypen konnten nur zu ca. 70% korrekt einem Tumorsubtyp zugeordnet werden [14].

Dies entspricht der Tendenz, die sich auch in dieser Arbeit erkennen lässt. So zeigte sich, dass allein durch die Überstandszytologie 28,9% der SCLC diagnostiziert werden konnten. Im Vergleich dazu konnten bei allen anderen Tumortypen nur 21,3% positive Diagnosen gestellt werden.

Die bessere Erkennbarkeit der SCLC liegt dabei vermutlich an der hohen Zellularität, geringeren Kohäsivität und dem relativ spärlichen fibrovaskulären Stroma.

6.4.3 Einfluss des Gradings

Das Grading wurde für diese Arbeit an den histologischen Präparaten mit den in Punkt 4.2.4.3.3 beschriebenen Kriterien erhoben. Anschließend wurde betrachtet, ob das Grading einen Einfluss auf die diagnostische Treffsicherheit der Überstandsdiagnostik oder den Vergleich der beiden Verfahren hat. Dabei wurden alle Proben in die Stufen G1-G4 eingeteilt.

Dabei zeigte sich in der Betrachtung der Gradinggruppen G1-G4 in Bezug auf die Ergebnisse der Überstandszytologie mit einem p-Wert von 0,356 kein signifikanter Unterschied.

Anschließend wurden die Gradinggruppen G1-G3 unter Ausschluss von G4 geprüft, da die Gruppe G4 vor allem aus SCLC besteht. So konnten mit den Gruppen G1-G3 gezielt die NSCLC, überwiegend bestehend aus Adeno- und Plattenepithelkarzinomen, betrachtet werden. Es zeigte sich mit einem p-Wert von 0,897 ebenfalls kein signifikanter Unterschied.

Mit $p=0,734$ zeigte sich auch in dem Vergleich der beiden Verfahren, dass kein signifikanter Einfluss besteht.

Dies zeigt, dass die Methode der Überstandszytologie, unabhängig vom Differenzierungsgrad des Tumors, gleichwertige Ergebnisse erbringt und somit für alle Gradingstufen, unabhängig vom Tumortyp (v.a. NSCLC (G1-G3) versus v.a. SCLC (G4)) zur Diagnostik geeignet ist.

6.5 Vergleich Überstandsdiagnostik mit Histologie

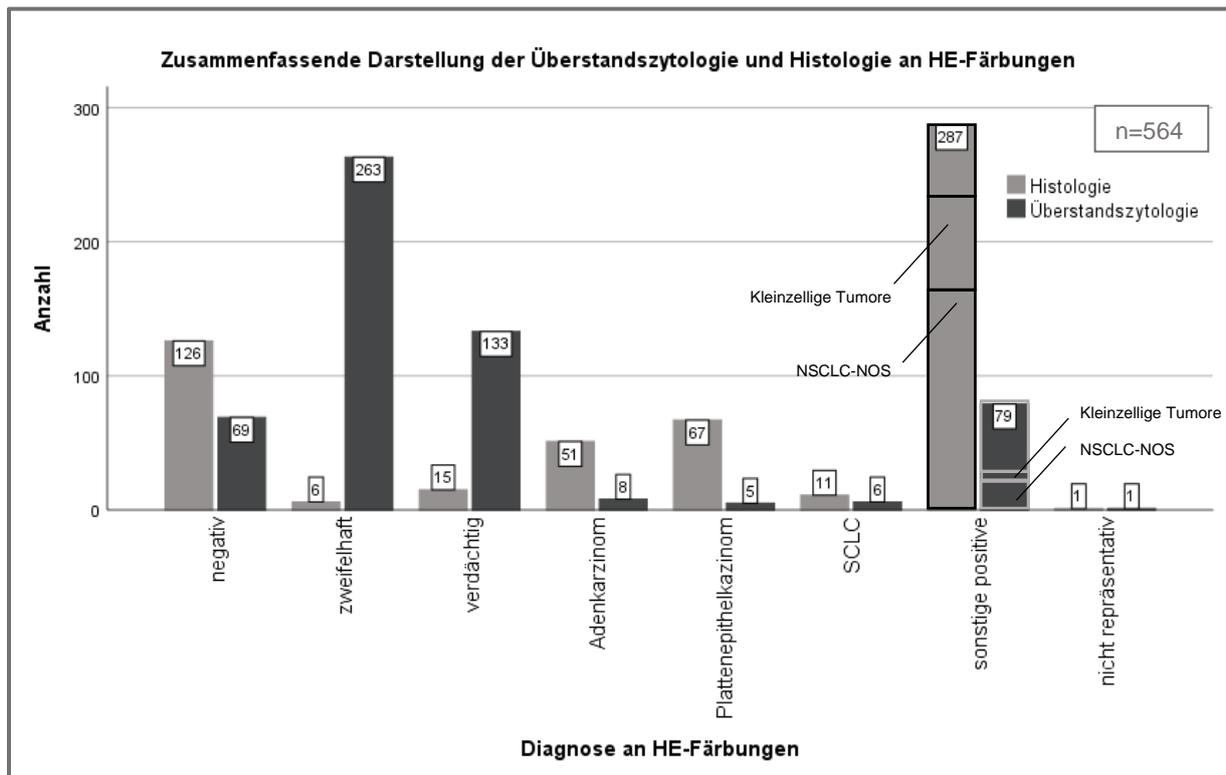


Abbildung 40: Zusammenfassende Darstellung der zytologischen Überstandsdiagnostik und Histologie an HE-Färbungen

Sonstige maligne Tumore enthält Carcinoma in situ, NSCLC, kleinzellige Tumore, seltene maligne Tumore, Metastasen

Wie Abbildung 40 verdeutlicht wurden in der Überstandszytologie n=98 positive Diagnosen inkl. Carcinoma in situ gestellt. In der Histologie konnten dagegen n=416 gestellt werden. Zweifelhafte und verdächtige Befunde wurden in n=263, bzw. n=133 Fällen in der Überstandszytologie und in n=6, bzw. n=15 in der Histologie ermittelt.

In n=1 (1,0%) der 98 positiven Überstandsbefunde kann in der Histologie keinerlei Hinweise auf einen malignen Tumor gefunden werden. Die Tumordiagnose wird in diesem Fall nur anhand der Überstandszytologie und deren Immunfärbung gestellt. Die zusätzliche Aufarbeitung der Überstandsdiagnostik ermöglicht so die Diagnose eines malignen Tumors ohne eine weitere diagnostische Maßnahme. Ohne die Ergebnisse der Überstandszytologie hätte der Patient eine falsch negative Diagnose erhalten oder hätte bei weiterhin bestehendem Tumorverdacht erneut einer Bronchoskopie oder invasiveren Untersuchungen zugeführt werden müssen.

Die Überstandszytologie zeigt jedoch wesentlich mehr „zweifelhaft“ und „verdächtige“ Befunde als die Histologie. In Punkt 5.2.5 wird gezeigt, dass in n=308 Fällen diese „zweifelhaften“ und „verdächtigen“ Befunde wahrscheinlich wirklich auf einen Tumor hinweisen. Davon zeigt in

n=260 Fällen die Histologie mit eventuellen Immunfärbungen ein positives Ergebnis. In n=6 Fällen zeigt die Histologie an HE-Färbungen ebenfalls einen auffälligen Befund, während sie in n=39 Fällen „negativ“ war. Bei diesen n=39 Fällen lässt sich durch die Überstandszytologie ein maligner Tumorverdacht begründen und durch weitere Einsendungen mit Proben der gleichen Lokalisation bestätigen, während die Histologie keinerlei Hinweise auf eine maligne Tumorerkrankung gibt.

Die Tatsache, dass in n=39 (6,9%) von 564 Fällen bei unauffälliger Histologie die Überstandszytologie auf einen Tumor hinweist, verdeutlicht, dass die Betrachtung der Überstandszytologie durchaus adäquate Tumordiagnosen erlaubt und zum Vorteil für die Patienten mitverarbeitet werden sollte.

Auch Travis et al. beschreiben einen Anteil von <5%, in denen die zytologischen Präparate ein besseres Bild zur Klassifikation von Adenokarzinomen oder Plattenepithelkarzinomen bieten als die histologischen Proben [48].

Bei n=88 Überstandspräparaten ergaben die weiteren Abklärungen keine Malignitätshinweise. Von diesen 88 Fällen kann der maligne Tumorverdacht in n=5 Fällen direkt mit Immunfärbungen widerlegt werden.

Mit nur n=69 „negativen“ Befunden zeigt die Überstandsdiagnostik in weniger Fällen eine negative Diagnose als die Histologie mit n=129. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass dem befundenden Arzt in den histologischen Präparaten ganze Gewebstücke zur Befunderhebung vorliegen, während bei der Überstandszytologie nur einzelne Zellen betrachtet werden können. Somit reicht bereits eine, z. B. durch Entzündung, alterierte Zelle, um einen tumorös auffälligen zytologischen Befund zu verursachen, während bei der Histologie durch das Gesamtbild die Diagnose einer Entzündung gestellt werden kann.

W. Travis et al. beschreiben in ihrer Arbeit „Diagnosis of Lung Cancer in Small Biopsies and Cytology“, dass die Genauigkeit von zytologischen Proben im Vergleich zu Diagnosen an Resektaten 96% betrug. Davon konnten Adenokarzinome und Plattenepithelkarzinome nur in 3% nicht weiter klassifiziert werden. Wurden zusätzlich noch Immunfärbungen angewandt, konnte sogar eine Treffsicherheit von 100% erreicht werden [49].

Da die Zytologie und die Histologie einer Biopsie ergänzende Verfahren sind, ist eine Befundung in Zusammenschau der beiden Methoden enorm wichtig. Dadurch lässt sich laut Travis et al. eine Übereinstimmung zwischen Histologie und Zytologie von 93% erreichen [49].

Ebenfalls beschäftigten sich A. Rosell et al. mit verbesserten Diagnosemöglichkeiten der zytologischen Methoden. A. Rosell et al. befassten sich dabei mit Proben von n=93 Patienten

mit Verdacht auf einen malignen Lungentumor. Wie in dieser Arbeit wurde zur zytologischen Diagnostik dabei die Überstandsflüssigkeit von Bronchialbiopsien verwendet [42].

A. Rosell et al. legten die Biopsien dafür zuerst in Salzlösung (Balanced Salt Solution) ein, welche sie dann im Folgenden zytologisch aufarbeiteten. Die Biopsien wurden der Salzlösung entnommen und in Formalin fixiert. Bei $n=82$ dieser $n=93$ Patienten konnte ein Tumor diagnostiziert werden, bei $n=8$ (9,7%) davon erfolgte die Diagnosestellung nur anhand der abgeschilferten Zellen in der Salzlösung. In fast 82% stimmte das zytologische Ergebnis mit der Histologie überein und erhöhte sogar die diagnostische Wertigkeit einer bronchoskopischen Untersuchung mit Biopsieentnahme von 65,8% auf 70,7%, was einer Steigerung von mehr als 4% entspricht [42].

Betrachtet man zusätzlich weitere zytologischen Methoden, wie Lavagen, so konnten A. Rosell eine diagnostische Steigerung durch die Kombination zytologischer Verfahren bei $n=10$ Patienten feststellen. Dies entspricht einer positiven Zunahme der bronchoskopischen Diagnosemöglichkeiten von insgesamt 12,2% durch zytologische Methoden [42].

Vergleicht man die statistischen Parameter kann mit den vorliegenden Werten nur der PPW als vergleichbar gewertet werden. Dieser lag bei beiden Methoden bei 0,99 und zeigt somit sehr gute Werte.

Bei der Einordnung der malignen Tumore in die jeweiligen Tumorsubgruppen „Adenokarzinom“, „Plattenepithelkarzinom“ und „SCLC“ zeigt sich, dass die Histologie erwartungsgemäß (Goldstandard) eine bessere Zuordnung ermöglicht. Sie kann einen Anteil von 30,0% ($n=129$) aller 430 positiven Tumordiagnosen aus dem besten erreichten Ergebnis aus Überstandszytologie, Histologie und Immunfärbungen direkt einer der drei Gruppen zuordnen. Die Überstandsdiagnostik schafft dies nur mit einem Anteil von 4,4% ($n=19$). Eine Begründung für die bessere Klassifikation in der Histologie ist, dass hier größere Gewebstücke zu erkennen sind, während in der Überstandszytologie genau wie auch bei der Zytologie von BRAS/BAL meist nur einzelne Zellen erfasst werden [46].

Auch in der Anzahl der weiterführenden Diagnostik, den Immunfärbungen, zeigen sich Unterschiede. So werden in der Histologie fast standardmäßig Immunfärbungen angefertigt und befundet, während in der Überstandszytologie lediglich in 11 der 564 Fällen Immunfärbungen angefertigt werden mussten. Die Erklärung dieser Differenz liegt darin, dass die endoskopische Bronchoskopie mit Probengewinnung zur histologischen Auswertung als Goldstandard gilt [46], während die Überstandszytologie noch kein etabliertes Standardverfahren ist und in Kombination mit Immunfärbungen seltener angewandt wird. Kann in der Histologie eine entsprechende Diagnose gestellt werden, wird auf die Immunfärbung der Überstandszytologie

verzichtet, um Material zu schonen und nur das Präparat mit der HE-Färbung betrachtet. Kann die Histologie jedoch kein adäquates Ergebnis liefern, wird versucht, einen eventuellen Verdacht auf einen malignen Tumor an der Überstandszytologie zu beweisen oder zu widerlegen, was wie in Punkt 5.3 beschrieben durchaus zur Diagnose eines malignen Tumors führen kann. Eine weitere Analysemöglichkeit des zytologischen Überstandsmaterials ist durch die in den letzten Jahren häufiger angewandte Histogelblockmethode zu erwarten (siehe Punkt 6.6.1 in der Diskussion).

Ein weiterer großer Vorteil der Überstandszytologie gegenüber der Histologie besteht in der schnellen Aufarbeitung. Die ersten Präparate, die aus der Überstandsflüssigkeit gewonnen werden, liegen den befundenden Ärzten bereits an dem Tag vor, an dem die Einsendung erfolgt. Die histologischen Präparate hingegen müssen über Nacht fixiert und prozessiert werden und können so frühestens am darauffolgenden Tag befundet werden.

Ein wichtiger Punkt ist auch, dass die histologischen, zytologischen (zum Beispiel BRAS und BAL) und die überstandszytologischen Präparate von einem Arzt befundet werden und nicht an verschiedene Ärzte gereicht werden, da aus der Zusammenschau der beiden Methoden die Diagnose am adäquatesten gestellt werden kann. So kann auch am besten entschieden werden, an welchem der Präparate man am sinnvollsten eine weitere Immundiagnostik durchführt, um möglichst materialschonend die beste Diagnose für den Patienten zu stellen.

6.6 Vor- und Nachteile der Überstandszytologie

Die Überstandszytologie benötigt keine zusätzlichen klinischen oder interventionellen Untersuchungen und ist somit für den Patienten sehr schonend. Damit kann eventuell weiteres Zellmaterial gewonnen werden und dem Patienten eine Rebronchoskopie, eine transthorakale Probeentnahme oder im schlechtesten Fall eine explorative Thorakotomie mit ihren Risiken wie Infektionen, Blutungen, Wundheilungsstörungen, etc. erspart werden.

Außerdem ist die Überstandszytologie ein sehr materialschonendes Verfahren. So können aus den abgeschilferten Zellen des Biopsats, die für gewöhnlich verworfen werden, weitere Präparate in Form von Zytospinpräparaten und zytologischen Histogelblöcken hergestellt werden. An diesen Gelblöcken können zu einem späteren Zeitpunkt noch weiterführende Untersuchungen, wie z. B. DNA-Analysen und Immunfärbungen, vorgenommen werden.

Während die Präparate aus den zytologischen Histogelblöcken und die histologischen Präparate aufbereitungstechnisch erst am folgenden Tag verfügbar sind, können die Zytospinpräparate noch am Einsendetag befundet werden. Dies erlaubt so bereits am Untersuchungstag eine erste Einschätzung und bei positiven Proben bereits eine Tumordiagnose.

Ein Nachteil der Überstandszytologie ist, wie bei allen zytologischen Methoden, dass häufig nur einzelne Zellen und keine Gewebstücke im Präparat enthalten sind. So lässt sich in manchen Fällen schwer entscheiden, ob die Zellveränderungen durch einen malignen tumorösen Vorgang ausgelöst werden oder zum Beispiel von einer ungewöhnlich schweren Entzündung herrühren. Auch ist eine detaillierte Subtypisierung häufig nicht möglich, da in vielen Fällen kein Wachstumsmuster bestimmt werden kann. Dieses Problem zeigt sich jedoch auch bei bereits etablierten zytologischen Verfahren wie BAL oder BRAS. Andererseits sind in den zytologischen Proben nicht selten z. B. bei floriden Entzündungen zahlreiche segmentkernige neutrophile Granulozyten erkennbar und damit Rückschlüsse auf eine höhergradige Entzündung möglich.

6.6.1 Vorteil der zytologischen Gelblöcke

Ziel der zytologischen Asservierung von Material ist die Möglichkeit der differenzierteren Diagnostik inklusive verschiedener Zusatzuntersuchungen.

So beschreiben W. D. Travis et al. in einer gemeinsamen Arbeit der International Association for the Study of Lung Cancer, der American Thoracic Society und der European Respiratory Society, dass jedes flüssige Material von Aspiraten oder Pleuraflüssigkeiten als Gelblock auf-

gearbeitet und archiviert werden sollte, um daran immunhistochemische oder molekulare Untersuchungen durchzuführen, da die beschriebenen Flüssigkeiten oft mehr Tumorzellen oder Tumor-DNA enthalten als die herkömmlichen Biopsien [48].

W. D. Travis et al. berichten von einer Studie von N. Rekhtman et al., laut derer das zytologische Material für die Mutationsanalyse des Epidermal-Growth-Factor-Receptor-Gens (EGFR) und des Kirsten-rat-sarcoma-viral-oncogene (KRAS) in 98% der Fälle (n=128) geeignet war. Von diesen Fällen konnten in 25% eine EGFR- und in 20% ein KRAS-Mutation nachgewiesen werden [39,49].

Auch S. Kumar et al. untersuchten die Materialausbeute bei klassischen zytologischen Abstrichpräparaten und an Zellblöcken bei verschiedenen flüssigen zytologischen Proben. Dabei stellten sie fest, dass durch die Betrachtung der Präparate aus den Zellblöcke die Malignitätsdiagnostik um 8,3% gesteigert werden konnte, indem ein Tumorverdacht aus den klassischen Abstrichpräparaten definitiv bestätigt werden konnte. S. Kumar et al. empfehlen daher ebenfalls die routinemäßige Anfertigung von Gelblöcken [28].

Auch in der vorliegenden Arbeit zeigt sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) zwischen den Präparaten aus den zytologischen Histogelblöcken und den klassischen Zytospinpräparaten. So zeigte der zytologische Histogelblock mehr als doppelt so oft ein positives Ergebnis als das Zytospinpräparat. Dies zeigt, dass die zytologischen Histogelblöcke auch in dieser Arbeit eine gute Materialausbeute lieferten.

In einer Umfrage von J. Crapanzano et al. zeigte sich bei 90 befragten Pathologen und Mitglieder der American Society of Cytopathology, dass es keine standardisierte Methode zur Herstellung von Blöcken gibt. So wurden in den verschiedenen Institutionen insgesamt 10 verschiedene Herstellungsmethoden verwendet [18].

Bei der Auswertung dieser verschiedenen Methoden wurde festgestellt, dass keines der Verfahren einen signifikanten Vorteil birgt. Die Befragten gaben jedoch an, dass eine geringe zelluläre Ausbeute häufig das Hauptproblem darstellte, die Blöcke zur weiteren Diagnostik jedoch einen wichtigen Anteil haben würden und deshalb die Optimierung der Herstellung eine große Rolle spielen würde [18].

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich zudem an standardmäßigen BRAS-Präparaten, dass eine Aufarbeitung zu Paraffinblöcken mit oder ohne Histogel als gleichwertig zu betrachten ist und keine der beiden Methoden einen signifikanten Vorteil bietet.

Um auch aus sehr spärlichem oder sehr heterogenem Material in den Histogelblöcken trotzdem gute Ergebnisse zu gewinnen, gibt es inzwischen viele verschiedene Möglichkeiten.

Eine davon ist die Laser-Mikrodissektion. Hierbei werden durch einen Laser einzelne, verstreut in dem zytologischen Gelblock liegende Zellen isoliert und können so als homogene Gruppe weiterbearbeitet werden. Dadurch kann die Empfindlichkeit der molekularen Untersuchungsmethoden deutlich gesteigert werden [16]. Dies beschreiben auch L. Bubendorf et al. bei der Analyse von EGFR-Mutationen an zytologischem Material. So lassen sich aus routinemäßig verarbeiteten zytologischen Präparaten mittels laser-assistierter Mikrodissektion Einzelzellen und kleine Zellgruppen isolieren und daran problemlos eine EGFR-Analyse durchführen [13]. Weitere neue Bearbeitungsmethoden der zytologischen Histogelblöcke zeigen zum Beispiel U. Malapelle et al. mit der next-generation-sequencing (NGS). NGS sind neue Methoden zur Sequenzierung von DNA-Abschnitten, die ebenfalls an dem Material der zytologischen Histogelblöcke durchgeführt werden können [31].

6.7 Biasbetrachtung

Bei dieser Arbeit gibt es einzelne Faktoren, die die Ergebnisse der hier betrachteten Fälle verfälschen können. Bei dieser Arbeit handelt es sich um eine retrospektive Studie. Bei fehlenden Angaben wurde versucht, diese nach Möglichkeit mit Hilfe der Klinik für Innere Medizin V – Pneumologie, Allergologie, Beatmungs- und Umweltmedizin des UKS zu ergänzen, was beim größten Teil der Fälle gelang.

Ein weiterer Punkt ist Expertise der befundenden Ärzte. Die Befundung und Diagnosestellung der Präparate erfolgte durch verschiedene Fachärzte Instituts für Pathologie des UKS. Daher können auch Unterschiede in der Erfahrung und Routine in der Befundung der Fachärzte als Bias in Betracht kommen.

Des Weiteren fand für die Fachärzte auch keine Verblindung, was die Ergebnisse der beiden Methoden der Histologie und Überstandszytologie betrifft, statt.

Bei dem betrachteten Stichprobenumfang von $n = 564$ Proben handelt es sich im Vergleich zu anderen Dissertationen um ein mittelgroßes Probenkollektiv. Im Vergleich dazu betrachtete S. Osche mit insgesamt $n = 1014$ Patienten mit Verdacht auf einen malignen Tumor fast doppelt so viele Proben wie in dieser Arbeit [34]. I. Born hingegen untersuchte nur $n = 210$ Patienten mit Verdacht auf einen malignen Lungentumor [11]. Auch die Arbeiten von S. Schröder und T. Günther, sowie N. Panarelli et al. zeigten mit $n = 89/160$ positiven zytologischen Soor-, bzw. $n = 6/92$ positiven Giardiasis-Diagnosen recht kleine Stichprobenumfänge [35,45].

6.8 Fazit

Geht man von der Hypothese aus, dass die in der Histologie gebräuchliche Fixationslösung abgeschilferte Tumorzellen enthält, bietet die Methodik der Überstandszytologie eine zusätzliche, potenziell wertvolle diagnostische Möglichkeit.

Eine primäre Tumordiagnose kann bei negativen histologischen Resultaten allein durch die Überstandszytologie in <1% der Fälle erwartet werden. In weiteren 54,4% führten weitere Abklärungsmaßnahmen (Histologie, Immunfärbungen, andere Einsendungen der gleichen Lokalisation) zweifelhafter und verdächtiger Befunde zur Tumordiagnose, sodass zusätzliches Tumorzellmaterial gesichert/archiviert werden konnte.

Die überstandszytologische Diagnostik allein ist aber der histologischen Diagnostik (Goldstandard) insgesamt nicht überlegen. So zeigt sich in der vorliegenden Arbeit, dass die Histologie an HE-Färbungen mit n=416 wesentlich mehr Tumordiagnosen stellen kann als die Überstandszytologie mit n=98.

In der Gruppe der zweifelhaften/verdächtigen konnte in ca. 21% der Fälle in der Histologie oder Folgeuntersuchungen kein Tumor an der gleichen Lokalisation gefunden werden.

Aber in dem weitaus größeren Anteil (entsprechend 79%) zeigt sich, dass durch die Histologie oder weiteren Untersuchungen (Immunfärbungen, weitere Einsendungen) der auffällige Befund bestätigt werden kann.

Für den Patienten stellt die Aufarbeitung in Form der Überstandszytologie in der Regel kein weiteres Risiko, sondern einen Vorteil dar, da sich eine weitere Möglichkeit für eine Diagnosestellung bei nur einer einzigen Probeentnahme ergibt.

Auch für die behandelnde Klinik ergibt sich aus der Aufarbeitung und Befundung des Zellmaterials aus der Fixationslösung keinerlei Mehraufwand.

In Kombination mit der Gelblocktechnik kommt der Überstandszytologie die Bedeutung eines längerfristig zugänglichen Archivmaterials zu. Es ist daher davon auszugehen, dass an diesem konservierten Probenmaterial der Einsatz künftiger Testverfahren, z. B. morphomolekulare Ergänzungsdagnostik, mit voraussichtlich sehr guter Qualität der Proteine und Nukleinsäuren des Tumorgewebes, möglich ist.

7 Literaturverzeichnis

1. Andolfi M, Potenza R, Capozzi R, Liparulo V, Puma F, Yasufuku K (2016) The role of bronchoscopy in the diagnosis of early lung cancer: a review. *Journal of Thoracic Disease* 8:3329–3337
2. AWMF (2022) S3-Leitlinie Lungenkarzinom - Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms. Kapitel 5, 6; 74-145
3. Barrera-Rodriguez R, Morales-Fuentes J (2012) Lung cancer in women. *Lung Cancer: Targets and Therapy* 3:79–89
4. Basumallik N, Agarwal M (2022) Small cell lung cancer. StatPearls Publishing, Trasure Island (FL). URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482458/>
5. Binesh F, Pirdehghan A, Mirjalili MR, Samet M, Majomerd ZA, Akhavan A (2015) Comparative assessment of the diagnostic value of transbronchial lung biopsy and bronchoalveolar lavage fluid cytology in lung cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 16:201–204
6. Böcker W, Denk H, Heitz PhU, Höfler G, Kreipe H, Moch H (2012) Pathologie. Urban & Fischer, München. Kapitel 24.9; 506-513
7. Bohle RM, Schnabel PA (2016) Grading von Lungenkarzinomen. *Der Pathologe* 37:314–319
8. Boland JM, Wampfler JA, Yang P, Yi ES (2017) Growth pattern-based grading of pulmonary adenocarcinoma—analysis of 534 cases with comparison between observers and survival analysis. *Lung Cancer* 109:14–20
9. Boloker G, Wang C, Zhang J (2018) Updated statistics of lung and bronchus cancer in united states (2018). *Journal of Thoracic Disease* 10:1158–1161
10. Boosarngsuk V, Raweelert P, Sukprapruet A, Chaiprasithikul R, Kiatboonsri S (2010) Factors affecting the diagnostic yield of flexible bronchoscopy without guidance in pulmonary nodules or masses. *Singapore Medical Journal* 660–665
11. Born I (2016) Verbesserung der Treffsicherheit der zytologischen Lungenkarzinomdiagnostik mittels adjuvanter Fluoreszenz-insitu-Hybridisierung und DNA-Bildzytometrie. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf. URL: <https://d-nb.info/1097512630/34>
12. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A (2018) Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Cancer Journal for Clinicians*
13. Bubendorf L., Savic. S. (2009) Prädiktive EGFR-Genanalysen in der Zytologie. *Der Pathologe* 136–139
14. Bubendorf L, Feichter GE, Obermann EC, Dalquen P (2011) Pathologie: Zytopathologie. Springer, Berlin, Heidelberg. Kapitel 13; 261-299
15. Canberk S, Tischler V, Engels M (2020) Current topics and practical considerations of cytology practice in lung cancer: reflexions from the lung symposium at the 42nd european congress of cytology, Malmö, 2019. *Acta Cytologica* 64:463–470

16. Chowdhuri SR, Hanson J, Cheng J, Rodriguez-Canales J, Fetsch P, Balis U, Filie AC, Giaccone G, Emmert-Buck MR, Hipp JD (2012) Semiautomated laser capture microdissection of lung adenocarcinoma cytology samples. *Acta Cytologica* 56:622–631
17. Chrabańska M, Środa M, Kiczmer P, Drozdowska B (2020) Lung cancer cytology: can any of the cytological methods replace histopathology? *Journal of Cytology* 37:117–121
18. Crapanzano JP, Heymann JJ, Monaco S, Nassar A, Saqi A (2014) The state of cell block variation and satisfaction in the era of molecular diagnostics and personalized medicine. *Cytojournal* 11:7
19. Damjanov I, Fan F, Suster S, Moran C (2013) *Cancer grading manual*. Springer, Heidelberg. Kapitel 5; 23-30
20. DiBonito L, Colautti I, Patriarca S, Falconieri G, Barbazza R, Vielh P (1991) Cytological typing of primary lung cancer: study of 100 cases with autopsy confirmation. *Diagnostic Cytopathology* 7:7–10
21. Ficker J (2008) *Physiologie und Pathophysiologie der bronchialen Sekretion*. *Pneumologie* 62:11–13
22. Hammerschmidt S, Wirtz H (2009) Lung cancer: current diagnosis and treatment. *Deutsches Ärzteblatt International* 106:809–820
23. Herold G, Mitarbeiter (2017) *Innere Medizin*. Herold, Köln. 400-406
24. Hiroshima K, Akihiko Y., Takenaka A, Haba R, Kawahara K, Minami Y, Kakinuma H, Shibuki Y, Miyake S, Kajio K, Miyamoto K, Nagatomo M, Nishimura S, Mano M, Matsubayashi J, Motoi N, Nagao T, Nakatsuka S, Yoshida T, Satoh Y (2020) Cytology reporting system for lung cancer from the japan lung cancer society and japanese society of clinical cytology: an interobserver reproducibility study and risk of malignancy evaluation on cytology specimens. *Acta Cytologica* 64:452–462
25. Kabir Z, Connolly GN, Clancy L (2008) Sex-differences in lung cancer cell-types? An epidemiologic study in ireland. *The Ulster Medical Journal* 77:31–35
26. Kadota K, Nitadori J, Woo KM, Sima CS, Finley DJ, Rusch VW, Adusumilli PS, Travis WD (2014) Comprehensive pathological analyses in lung squamous cell carcinoma: single cell invasion, nuclear diameter and tumor budding are independent prognostic factors for worse outcomes. *Journal of Thoracic Oncology* 9:1126–1139
27. Kirchner T, Müller-Hermelink HK (2018) *Kurzlehrbuch Pathologie*. Urban & Fischer, München. Kapitel 11.6; 354-361
28. Kumar SH, S S, Shetty D, Rao R (2020) Clinicopathological study of 117 body fluids: comparison of conventional smear and cell block technique. *Current Health Sciences Journal* 46:336–343
29. Lokuhetty D, White V, Cree, Herausgeber (2021) *Thoracic tumours: WHO classification of tumours*. International Agency for Research on Cancer, Lyon. 20-36, 64-93, 98, 127-129, 139-143
30. Mairinger T (2019) *Histologie, Zytologie und Molekulardiagnostik des Lungenkarzinoms*. *Der Pathologe* 40:649–661

31. Malapelle U, Mayo-de-Las-Casas C, Molina-Vila MA, Rosell R, Savic S, Bihl M, Buben-dorf L, Salto-Tellez M, Biase D de, Tallini G, Hwang DH, Sholl LM, Luthra R, Weyand B, Borght SV, Missiaglia E, Bongiovanni M, Stieber D, Vielh P, Schmitt F, Rappa A, Barberis M, Pepe F, Pisapia P, Serra N, Vigliar E, Bellevicine C, Fassan M, Rugge M, Andrea CE de, Lozano MD, Basolo F, Fontanini G, Nikiforov YE, Kamel-Reid S, Santos G da C, Nikiforova MN, Roy-Chowdhuri S, Troncione G (2017) Consistency and reproducibility of next-generation sequencing and other multigene mutational assays: a worldwide ring trial study on quantitative cytological molecular reference specimens. *Cancer Cytopathology* 125:615–626
32. Nakhosteen JA, Khanavkar B, Darwiche K, Scherff A, Hecker E, Ewig S (2009) Atlas und Lehrbuch der Thorakalen Endoskopie. Springer, Heidelberg. Kapitel 2,3,5,8; 11-85, 91-154, 209-220
33. Okachi S, Imai N, Imaizumi K, Iwano S, Ando M, Hase T, Aso H, Morise M, Wakahara K, Ito S, Hashimoto N, Sato M, Kondo M, Hasegawa Y (2016) Factors affecting the diagnostic yield of transbronchial biopsy using endobronchial ultrasonography with a guide sheath in peripheral lung cancer. *Internal Medicine* 55:1705–1712
34. Osche S (2003) Die Aussagekraft der bronchoskopisch gewonnenen Lungenzytologie bei der Malignomsuche. Albert-Ludwigs-Universität Freiburg/Breisgau, Freiburg. URL: <https://freidok.uni-freiburg.de/fedora/objects/freidok:1079/datastreams/FILE1/content>
35. Panarelli NC, Gobara N, Hoda RS, Chaump M, Jessurun J, Yantiss RK (2017) Cytology preparations of formalin fixative aid detection of giardia in duodenal biopsy samples. *The American Journal of Surgical Pathology* 41:570
36. Pelosi G, Rodriguez J, Viale G, Rosai J (2005) Typical and atypical pulmonary carcinoid tumor overdiagnosed as small-cell carcinoma on biopsy specimens. *The American Journal of Surgical Pathology* 29:9
37. Petersen I (2013) Adenokarzinome der Lunge - die neue Klassifikation. *Zentralblatt für Chirurgie - Zeitschrift für Allgemeine, Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie* 138:16–24
38. Rekhtman N, Bishop JA (2011) Quick reference handbook for surgical pathologists. Springer, Heidelberg. 6,18
39. Rekhtman N, Brandt SM, Sigel CS, Friedlander MA, Riely GJ, Travis WD, Zakowski MF, Moreira AL (2011) Suitability of thoracic cytology for new therapeutic paradigms in non-small cell lung carcinoma: high accuracy of tumor subtyping and feasibility of EGFR and KRAS molecular testing. *Journal of Thoracic Oncology* 6:451–458
40. Reu S, Huber RM (2017) Kleinzelliges Lungenkarzinom: Pathologie und Biologie. *Der Onkologe* 23:340–346
41. Robert-Koch-Institut (2016) Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016. Kapitel 2.4; 32-35
42. Rosell A, Monsó E, Lores L, Vilà X, Llatjós M, Ruiz J, Morera J (1998) Cytology of bronchial biopsy rinse fluid to improve the diagnostic yield for lung cancer. *European Respiratory Journal* 12:1415–1418
43. Sagerup CMT, Smastuen M, Johannesen TB, Helland A, Brustugun OT (2011) Sex-specific trends in lung cancer incidence and survival: a population study of 40 118 cases. *BMJ Journal Thorax* 66:301–307

44. Scholzen T, Gerdes J (2000) The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of Cellular Physiology* 182:311–322
45. Schröder S, Günther T (2018) Verbesserte mikroskopische Diagnostik des ösophagealen Soorbefalls durch zusätzliche Zytopsin-Analyse der Fixationslösung von Ösophagusbiopsien. *Zeitschrift für Gastroenterologie* 56:752–755
46. Schütte W, Blankenburg T (2005) Diagnostische und therapeutische Konzepte bei Patienten mit Bronchialkarzinom und malignem Pleuramesotheliom. UNI-MED Verlag AG, Bremen-London-Boston. Kapitel 5; 27-44
47. Tian S (2017) Classification and survival prediction for early-stage lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma patients. *Oncology Letters*
48. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger KR, Yatabe Y, Beer DG, Powell CA, Riely GJ, Van Schil PE, Garg K, Austin JHM, Asamura H, Rusch VW, Hirsch FR, Scagliotti G, Mitsudomi T, Huber RM, Ishikawa Y, Jett J, Sanchez-Cespedes M, Sculier J-P, Takahashi T, Tsuboi M, Vansteenkiste J, Wistuba I, Yang P-C, Aberle D, Brambilla C, Flieder D, Franklin W, Gazdar A, Gould M, Hasleton P, Henderson D, Johnson B, Johnson D, Kerr K, Kuriyama K, Lee JS, Miller VA, Petersen I, Roggli V, Rosell R, Saijo N, Thunnissen E, Tsao M, Yankelewitz D (2011) International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *Journal of Thoracic Oncology* 6:244–285
49. Travis WD, Brambilla E, Noguchi M, Nicholson AG, Geisinger K, Yatabe Y, Ishikawa Y, Wistuba I, Flieder DB, Franklin W, Gazdar A, Hasleton PS, Henderson DW, Kerr KM, Petersen I, Roggli V, Thunnissen E, Tsao M (2013) Diagnosis of lung cancer in small biopsies and cytology: implications of the 2011 international association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society classification. *Archives of pathology & laboratory medicine* 137:668–684
50. Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG (2015) WHO classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. Lyon. 31-35
51. Valentini I, Lazzari L, Michieletto L, Innocenti M, Savoia F, Del Prato B, Mancino L, Maddau C, Romano A, Puerto A, Fois A (2018) Competence in flexible bronchoscopy and basic biopsy technique. *Panminerva Medica*
52. Warth A, Cortis J, Soltermann A, Meister M, Budczies J, Stenzinger A, Goeppert B, Thomas M, Herth FJF, Schirmacher P, Schnabel PA, Hoffmann H, Dienemann H, Muley T, Weichert W (2014) Tumour cell proliferation (Ki-67) in non-small cell lung cancer: a critical reappraisal of its prognostic role. *British Journal of Cancer* 111:1222–1229
53. Weichert W, Kossakowski C, Harms A, Schirmacher P, Muley T, Dienemann H, Warth A (2016) Proposal of a prognostically relevant grading scheme for pulmonary squamous cell carcinoma. *European Respiratory Journal* 47:938–946

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 01: TTF-1-positive Infiltrate eines Adenokarzinoms (Histologie).....	12
Abbildung 02: p40-positive Infiltrate eines Plattenepithelkarzinoms (Histologie)	12
Abbildung 03: CK18-positive Infiltrate eines SCLC (Histologie)	13
Abbildung 04: Proliferationsaktivität eines SCLC (Histologie)	13
Abbildung 05: Schematische Darstellung der Verarbeitung des eingesandten Probenmaterials.....	23
Abbildung 06: Negativer Befund (Überstandszytologie - Histogelblock).....	26
Abbildung 07: Negativer Befund (BRAS - Histogelblock)	27
Abbildung 08: Einteilung in Tumorsubgruppen	28
Abbildung 09: Negativer Befund (Überstandszytologie - Histogelblock).....	29
Abbildung 10: Zweifelhafter Befund (Überstandszytologie - Histogelblock).....	30
Abbildung 11: Verdächtiger Befund (Überstandszytologie - Histogelblock).....	30
Abbildung 12: Zellen eines Plattenepithelkarzinoms (Überstandszytologie - Histogelblock) .	31
Abbildung 13: Häufigkeitsverteilung der endgültigen Diagnosestellung unter Berücksichtigung von Überstandzytologie, Histologie und Immunfärbungen.....	35
Abbildung 14: Häufigkeitsverteilung der Entnahmelokalisationen aller Proben	36
Abbildung 15: Häufigkeitsverteilung der Karzinomarten in Bezug auf das Grading.....	37
Abbildung 16: Infiltrate eines Adenokarzinoms (Histologie)	38
Abbildung 17: Infiltrate eines Plattenepithelkarzinoms (Biopsie)	39
Abbildung 18: Infiltrate eines SCLC (Histologie)	39
Abbildung 19: Häufigkeitsverteilung der Tumorsubtypen anhand der Auswertung der histologischen Präparate an HE-Färbungen.....	40
Abbildung 20: Häufigkeitsverteilung der Tumorsubtypen anhand der Zusammenschau von HE-Färbungen und Immunfärbungen.....	41
Abbildung 21: Zellen eines NSCLC, Verdacht auf Adenokarzinom (Überstandszytologie - Histogelblock)	42
Abbildung 22: Zellen eines NSCLC, Verdacht auf Plattenepithelkarzinom (Überstandszytologie - Histogelblock)	43
Abbildung 23: Zellen eines kleinzelligen Tumors (Überstandszytologie - Histogelblock).....	43
Abbildung 24: Häufigkeitsverteilung der Tumorsubtypen anhand der Auswertung der Überstandszytologie an HE-Färbungen.....	44
Abbildung 25: Zweifelhafter Befund (Überstandszytologie - Histogelblock).....	45
Abbildung 26: Zweifelhafter Befund (Überstandszytologie - Zytospinpräparat)	45

Abbildung 27: Häufigkeitsverteilung der Tumorsubtypen anhand der Auswertung der Überstandszytologie unter Zuhilfenahme von Immunfärbungen.....	47
Abbildung 28: Vergleich der Überstandszytologie mit der Histologie in Bezug auf die Erkennung maligner Tumore.....	52
Abbildung 29: Verdächtiger Befund (Überstandszytologie - Histogelblock).....	55
Abbildung 30: Zellen eines TTF-1-positiven Adenokarzinoms (Überstandszytologie – Histogelblock)	56
Abbildung 31: Negativer Befund (Histologie)	56
Abbildung 32: Zellen eines NSCLC, Verdacht auf Adenokarzinom (Überstandszytologie - Histogelblock)	58
Abbildung 33: Infiltrate eines Adenokarzinoms (Histologie)	58
Abbildung 34: TTF-1-positive Infiltrate eines Adenokarzinoms (Histologie).....	59
Abbildung 35: Proliferationsaktivität eines Adenokarzinoms (Histologie)	59
Abbildung 36: Zweifelhafter Befund (Überstandszytologie - Histogelblock).....	60
Abbildung 37: Infiltrate eines NSCLC (Histologie).....	61
Abbildung 38: Infiltrate eines TTF-1-positiven Adenokarzinoms (Histologie).....	61
Abbildung 39: Häufigkeitsverteilung der Diagnosen an BRAS-Präparaten der beiden zytologischen Verfahren Paraffinblock und zytologischer Histogelblock.....	74
Abbildung 40: Zusammenfassende Darstellung der zytologischen Überstandsdiagnostik und Histologie an HE-Färbungen	86

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 01: Geräte und Materialien.....	17
Tabelle 02: Reagenzien.....	18
Tabelle 03: EDV-Programme.....	19
Tabelle 04: Indikationen zur Bronchoskopie	20
Tabelle 05: Fünfstufige Einteilung der Befunde der Überstandspräparate	29
Tabelle 06: Grading von Adenokarzinomen.....	32
Tabelle 07: Grading von Plattenepithelkarzinomen.....	32
Tabelle 08: Häufigkeitsverteilung der endgültigen Diagnosestellung unter Berücksichtigung von Überstandszytologie, Histologie und Immunfärbungen.....	35
Tabelle 09: Vergleich der Diagnosen des Zytoprinpräparats und des zytologischen Histogelblocks.....	46
Tabelle 10: Überblick über die auffälligen Überstandszytologien	48
Tabelle 11: Auffällige Überstandszytologien	49
Tabelle 12: Vergleich von Histologie und Überstandszytologie an HE-Färbungen.....	51
Tabelle 13: Vierfeldertafel der Histologie	53
Tabelle 14: Vierfeldertafel der Überstandszytologie.....	54
Tabelle 15: Ergebnis des Tests nach McNemar für Überstandszytologie und Histologie	63
Tabelle 16: Einfluss des Tumorsubtyps auf die Wertigkeit der Überstandszytologie.....	64
Tabelle 17: Prüfung der Wertigkeit der Überstandszytologie bei mikropapillären Adenokarzinomen	65
Tabelle 18: Prüfung der Wertigkeit der Überstandszytologie bei SCLC	67
Tabelle 19: Vergleich der beiden Verfahren in Bezug zum besten erreichten Ergebnis	68
Tabelle 20: Einfluss des Gradings auf die Wertigkeit der Überstandszytologie	69
Tabelle 21: Vergleich der beiden Verfahren im Bezug zum Grading.....	70
Tabelle 22: Auswertung der auffälligen Überstandszytologie in Bezug auf andere Proben...72	
Tabelle 23: Häufigkeitsverteilung der Diagnosen der BRAS-Präparate an HE-Färbungen im Vergleich zur Histologie	75
Tabelle 24: Korrelation zwischen den Verfahren des Histogelblocks und des Paraffinblocks77	
Tabelle 25: Verteilung der Tumorsubtypen in den zentralen und peripheren Lungenbereich83	

10 Publikationen

I. F. A. Flockerzi¹, M. Dölker¹, K. Rentz², G. Wagenpfeil³, R.M. Bohle¹

¹Institut für Pathologie

²Klinik für Innere Medizin V - Pneumologie, Allergologie, Beatmungs- und Umweltmedizin

³Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Medizinische Informatik (IMBEI)
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg (Saar)

104. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, Beitrag Arbeitsgruppe Zytopathologie, Juni 2020

„Zytologische Analyse der Fixationslösung bei Bronchialbiopsien – Untersuchungen zur kombinierten zyto- und histopathologischen Diagnostik“ (Vortrag)

11 Dank

Mein Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Rainer M. Bohle, Leiter des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes, der mir durch Bereitstellung meines Dissertationsthemas eine Promotion am oben genannten Institut ermöglicht hat. Außerdem möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Rainer M. Bohle für die vielseitige und umfassende Betreuung danken.

Großer Dank gilt auch Frau Dipl.-Stat. Gudrun Wagenpfeil und dem Institut für medizinische Biometrie, Epidemiologie und medizinische Informatik des Universitätsklinikums des Saarlandes, unter Leitung von Herrn Univ.-Prof. Dr. Stefan Wagenpfeil, für eine umfassende statistische Beratung und Bereitstellung der benötigten statistischen Programme.

Ebenfalls möchte ich Oberärztin Dr. med. Katharina Rentz für interessante Einblicke in die bronchoskopische Diagnostik und für die Einsichten in die Bronchoskopieberichte danken.

Ein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herr Dr. med. Fidelis A. Flockerzi, Assistenzarzt des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes, der für alle Fragen oder Probleme eine kompetente Lösung und gute Ratschläge hatte.

Für die Einblicke in die Laborarbeit im zytologischen Labor des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes danke ich Frau Janine Laubscher.

Bei Frau Elke Stenzhorn-Niemann bedanke ich mich für ihre Hilfestellungen bei der Arbeit im Archiv des Instituts für Pathologie des Universitätsklinikums des Saarlandes und bei Herrn Dr. rer. nat. Marc Becker und dem Tumorzentrum des Universitätsklinikums des Saarlandes für die Bereitstellung von Informationen aus dem saarländischen Krebsregister.

Ich bedanke mich auch bei Frau Angelika Klein für die Erklärungen zur Anfertigung und Bearbeitung der mikroskopischen Bildaufnahmen.

Ganz besonders möchte ich auch meiner Familie und meinem Freund danken, die mir das Studium der Humanmedizin und diese Dissertation ermöglicht und mich immer motiviert haben.

12 Anhang

12.1 Immunhistochemische Typisierung von CK positiven, morphologisch nicht unterscheidbaren NSCLC

TTF-1	P40	Muzinspuren	Diagnose an der Biopsie/Zellblock/Zytologie
Positiv (fokal oder diffus)	negativ	positiv	NSCLC, bevorzugt Adenokarzinom
Positiv (fokal oder diffus)	positiv (lokal)	positiv	NSCLC, bevorzugt Adenokarzinom
Negativ	positiv (diffus)	negativ	NSCLC, bevorzugt Plattenepithelkarzinom
Negativ	negativ	negativ	NSCLC-NOS
Negativ	positiv (fokal)	negativ	NSCLC-NOS
Keine Spuren vorhanden	keine Färbung vorhanden	negativ	NSCLC-NOS

Anhang 01: Immunhistochemische Typisierung von CK positiven, morphologisch nicht unterscheidbaren NSCLC der WHO-Klassifikation in der 5. Auflage
 modifiziert nach *Thoracic Tumours: WHO Classification of Tumours* [29]
 fokal: 1-10% der Zellen zeigen sich positiv; diffus: >10% der Zellen zeigen sich positiv

12.2 Verteilung der Tumorsubtypen auf die Lungenlokalisationen

12.2.1 Verteilung in der Lungenperipherie

	Lokalisation der peripher entnommenen Proben					Gesamt
	linker Oberlappen	linker Unterlappen	rechter Oberlappen	rechter Mittel-lappen	rechter Unterlappen	
AC						
absolute Anzahl (n)	32	21	28	8	16	105
relative Häufigkeit (%)	10,7%	7%	9,3%	2,7%	5,3%	35,0%
PEC						
absolute Anzahl (n)	24	18	28	9	10	89
relative Häufigkeit (%)	8,0%	6,0%	9,3%	3,0%	3,3%	29,7%
SCLC						
absolute Anzahl (n)	16	8	18	8	7	57
relative Häufigkeit (%)	5,3%	2,7%	6,0%	2,7%	2,3%	19,0%
NSCLC-NOS						
absolute Anzahl (n)	3	2	2	0	0	7
relative Häufigkeit (%)	1,0%	0,7%	0,7%	0,0%	0,0%	2,3%
Metastasen						
absolute Anzahl (n)	6	0	2	0	5	13
relative Häufigkeit (%)	2,0%	0,0%	0,7%	0,0%	7,7%	4,3%
Sonstige maligne Tumore						
absolute Anzahl (n)	3	5	5	1	7	21
relative Häufigkeit (%)	1,0%	1,7%	1,7%	0,3%	2,3%	7,0%
Carcinoma in situ						
absolute Anzahl (n)	2	5	1	0	0	8
relative Häufigkeit (%)	0,7%	1,7%	0,3%	0,0%	0,0%	2,7%
Gesamt						
absolute Anzahl (n)	86	59	84	26	45	300
relative Häufigkeit (%)	28,7%	19,7%	28,0%	8,7%	15,0%	100,0%

Anhang 02: Verteilung der Tumorsubtypen in der Peripherie

Insgesamt 300 von 425 diagnostizierten Tumoren, bei denen eine Lokalisationszuordnung möglich war, sind in der Peripherie lokalisiert.

12.2.2 Verteilung in zentralen Lungenbereichen

	Lokalisation der zentral entnommenen Proben			Gesamt
	rechts zentral	links zentral	Trachea bis Hauptkarina	
AC absolute Anzahl (n) relative Häufigkeit (%)	4 3,2%	11 8,8%	5 4,0%	20 16,0%
PEC absolute Anzahl (n) relative Häufigkeit (%)	25 20,0%	28 22,4%	3 2,4%	56 44,8%
SCLC absolute Anzahl (n) relative Häufigkeit (%)	5 4,0%	24 19,2%	4 3,2%	33 26,4%
NSCLC absolute Anzahl (n) relative Häufigkeit (%)	0 0,0%	1 0,8%	0 0,0%	1 0,8%
Metastasen absolute Anzahl (n) relative Häufigkeit (%)	1 0,8%	5 4,0%	2 1,6%	8 6,4%
Sonstige ¹ absolute Anzahl (n) relative Häufigkeit (%)	3 2,4%	2 1,6%	0 0,0%	5 4,0%
Carcinoma in situ absolute Anzahl (n) relative Häufigkeit (%)	0 0,0%	2 1,6%	0 0,0%	2 1,6%
Gesamt absolute Anzahl (n) relative Häufigkeit (%)	38 30,4%	73 58,4%	14 11,2%	125 100,0%

Anhang 03: Verteilung der Tumorsubtypen in den zentralen Lungenbereichen

Insgesamt 125 von 425 diagnostizierten Tumoren, bei denen eine Lokalisationszuordnung möglich war, sind in zentralen Bereichen lokalisiert.

¹sonstige maligne Tumore

12.2.3 Einflussfaktor Lokalisation auf die Überstandszytologie

Lokalisation	Überstandszytologie an HE-Färbungen				p-Wert nach exaktem Test nach Fisher
	negativ	zweifelhaft	verdächtig	positiv	
linke Lunge	29	71	43	31	0,099
rechte Lunge	24	103	56	30	
zentral	15	87	33	34	
linker Oberlappen	14	33	30	20	0,054
linker Unterlappen	15	38	13	11	
links zentral	4	29	10	8	
rechter Oberlappen	12	55	25	19	0,737
rechter Mittellappen	4	16	10	5	
rechter Unterlappen	8	32	21	6	
rechts zentral	11	42	21	20	

Anhang 04: Einfluss der Entnahmelokalisation auf die Wertigkeit der Überstandszytologie

12.2.4 Einflussfaktor Lokalisation auf die Wertigkeit auf den Vergleich der beiden Verfahren

Lokalisation	Vergleich der Verfahren an HE-Färbungen					p-Wert nach exaktem Test nach Fisher
	Überstandszytologie höherwertiger	Beide zeigen gleiche Diagnose	Histologie höherwertiger	Vergleich nicht möglich	Überstandszytologie auffällig, Histologie negativ ¹	
linke Lunge	7	32	115	0	20	0,105
rechte Lunge	15	36	123	2	38	
zentral	16	38	92	0	23	
linker Oberlappen	4	19	66	-	8	0,694
linker Unterlappen	3	13	49	-	12	
links zentral	4	9	31	-	7	
rechter Oberlappen	9	21	63	2	17	0,679
rechter Mittellappen	1	7	19	0	8	
rechter Unterlappen	5	8	41	0	13	
rechts zentral	9	21	53	0	11	

Anhang 05: Vergleich der beiden Verfahren in Bezug auf die Lokalisation

¹auch in anderen Einsendungen kein Karzinom zu finden

12.3 Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Fassung der Dissertation nicht veröffentlicht.

Tag der Promotion: 30.01.2024

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Rainer M. Bohle
Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Robert Bals